

Modifikation rekombinanter Spinnenseidenproteine für die Verwendung als Wirkstofftransportsysteme

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

- Doktor der Naturwissenschaften -

im Promotionsprogramm „Molekulare Biowissenschaften“ der Bayreuther
Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften

(BayNAT)

vorgelegt von

Martina B. Schierling (geb. Elsner)

(Master of Science)

aus Schlierbach

Bayreuth 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2011 bis August 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl Biomaterialien unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 27.08.2015

Zulassung durch das Leitungsgremium: 21.09.2015

Wissenschaftlichen Kolloquium: 04.02.2016

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Stephan Kümmel

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Scheibel	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Rainer Schobert	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Ruth Freitag	(Vorsitz)
Prof. Dr. Stephan Schwarzingen	

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY	4
1. EINLEITUNG	6
1.1 Wirkstoffaufnahme in Geweben und Zellen.....	6
1.1.1 Multiple Wirkstoff-Resistenzen (MDR)	10
1.1.2 Strategien zur Überwindung der Multiplen Wirkstoff-Resistenzen.....	11
1.2 Einsatzbereich des gezielten Wirkstofftransports.....	12
1.3 Mechanismen der Endozytose.....	13
1.3.1 Clathrin-vermittelte Endozytose.....	15
1.3.2 Caveolae-vermittelte Endozytose.....	18
1.3.3 Makropinozytose	19
1.4 Kontrollierter Wirkstofftransport.....	20
1.4.1 Partikuläre Wirkstofftransportsysteme.....	20
1.4.2 Modifikation von Transportsystemen mit Zell-penetrierenden Peptiden.....	23
1.4.3 Biomaterialien als Wirkstofftransportsysteme	28
1.5 Seide.....	29
1.5.1 Spinnenseide.....	29
1.5.2 Rekombinante Herstellung von Spinnenseide.....	32
1.5.2.1 Herstellung verschiedener Morphologien aus Spinnenseidenproteinen und ihre Verwendungen als Biomaterialien	34
1.5.2.2 Spinnenseidenproteinpartikel	36
1.5.2.3 Spinnenseidenproteinpartikel als Wirkstofftransportsystem.....	37
2. ZIELSETZUNG	39
3. SYNOPSIS	41
3.1 Zelluläre Aufnahme von Spinnenseidenproteinpartikeln	44
3.2 Einfluss der Beladung der Partikel auf die zelluläre Aufnahme	49
4. LITERATURVERZEICHNIS.....	57

5.	DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS	76
6.	PUBLIKATIONSLISTE	78
7.	TEILARBEITEN	79
7.1	Teilarbeit I	79
7.2	Teilarbeit II.....	91
7.3	Teilarbeit III	114
8.	DANKSAGUNG	130
9.	ERKLÄRUNG	132

Zusammenfassung

Spinnenseide zeigt neben ihren bemerkenswerten mechanischen Eigenschaften eine sehr gute Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit. Bereits in der Antike wurden deswegen Spinnennetze zum Abdecken von Wunden oder der Einzelfaden als Nahtmaterial verwendet und bis heute ist keine allergene Wirkung der natürlichen Spinnenseide bekannt. Für eine biomedizinische Nutzung im großen Maßstab ist das Material jedoch nicht geeignet, da Spinnen aufgrund ihres territorialen und kannibalistischen Verhaltens nicht im großen Stil gezüchtet werden können und ihre Seide Qualitätsschwankungen unterliegt. Die Seide besteht hauptsächlich aus Proteinen, die auch rekombinant hergestellt werden können. Die biotechnologisch hergestellten rekombinanten Seidenproteine lassen sich nicht nur in die natürliche Morphologie, den Faden, sondern auch in andere Morphologien überführen und bieten so ein breites Anwendungsspektrum, sowohl im technischen als auch im medizinischen Bereich.

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und seine modifizierten Varianten basieren auf der repetitiven Kernsequenz des *Araneus diadematus* Fibroin 4 (ADF4), welches ein Hauptbestandteil des Abseilfadens der europäischen Gartenkreuzspinne (*A. diadematus*) ist. In der vorliegenden Dissertation wurde mit Partikeln aus dem *engineered* ADF4 (eADF4(C16)) und seinen Varianten gearbeitet, wobei C eine Modulsequenz repräsentiert, die 16 mal wiederholt wird.

Vorangehende Arbeiten beschrieben bereits die Eignung von eADF4(C16)-Partikeln als Wirkstofftransportsystem, da die Partikel mit löslichen sowie unlöslichen nieder-molekularen Substanzen und kleinen Proteinen beladen werden können. Bisherige Forschungsarbeiten zur Aufnahme von Seidenpartikeln durch Zellen zeigten jedoch eine mäßige bis schlechte Aufnahmerate. Aus diesem Grund wurden in der hier vorliegenden Arbeit drei Strategien entwickelt, um die Interaktion der Partikel mit Zellen und somit deren Aufnahme zu erhöhen. Die erste Strategie beruht auf der Optimierung des Herstellungsprozesses, um Partikel kleiner und mit einer homogenen Größenverteilung zu erhalten. Dies konnte unter Verwendung der ionischen Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium Acetat erreicht werden. Die zweite Strategie beruht auf genetischer Kopplung von eADF4(C16) mit Zell-penetrierenden Peptiden (Tat-, R₈G-, RGD-Peptid), da die physikochemischen Eigenschaften sowie die Präsentation von Interaktionsmotiven auch eine wichtige Rolle spielen. Der dritten Strategie liegt eine Analyse der zellulären Partikelaufnahme in Abhängigkeit der Ladung zugrunde. Dazu wurde das

ebenfalls rekombinante, positiv geladene Spinnenseidenprotein eADF4(κ 16), verwendet. Aus allen Proteinen konnten sphärische Partikel hergestellt werden. Die Aufnahme von eADF4(C16) durch HeLa-Zellen erwies sich als gering, jedoch konnte durch das Einbringen von Zell-penetrierenden Peptiden sowie der Ladungsänderung (eADF4(κ 16)) eine Erhöhung der Aufnahmerate erreicht werden. Dies spiegelt sich sowohl in der Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln sowie der Anzahl der Partikel innerhalb einzelner Zellen wieder. Die höchste Aufnahme durch Zellen wurden mit den Proteinen eADF4(C16) R_8G und eADF4(κ 16) erzielt. Durch den Einsatz spezifischer Endozytose-Inhibitoren konnte die Clathrin-vermittelte Endozytose als wichtigster Mechanismus bei der Aufnahme der Spinnenseidenproteinpartikel identifiziert werden. Jedoch ist auch die Makropinozytose bei dem Aufnahmeprozess involviert.

Es wurden verschiedene Strategien zur Erhöhung der Partikel-Aufnahme durch Zellen analysiert. Durch die Modifikationen mit Zell-penetrierenden Peptiden und durch die Änderung der Ladung konnte die Aufnahme verbessert und der zugrunde liegende Mechanismus der Partikel-Aufnahme durch HeLa-Zellen geklärt werden. Diese Ergebnisse sind wichtige und vielversprechende Erkenntnisse für die Verwendung von Spinnenseidenpartikeln als Wirkstofftransportsystem. Da die Spinnenseidenproteinpartikel als Wirkstofftransportsysteme verwendet werden sollen, sollte auch der Einfluss der Beladung auf den Aufnahmemechanismus sowie die Aufnahme untersucht werden.

Aufgrund ihrer positiven Ladung eignen sich eADF4(κ 16)-Partikel als Gentransporter, sodass hier eine einzelsträngige, fluoreszenzmarkierte Modell-DNA-Sequenz (F1-ODN) als Cargo gewählt wurde. Nach der Beladung war jedoch die Aufnahme in HeLa-Zellen drastisch reduziert. Durch eine zusätzliche Beschichtung mit einer eADF4(κ 16)-Lösung konnte die Aufnahme wieder erhöht werden, sodass wieder das Niveau unbeladener eADF4(κ 16)-Partikel erreicht wurde.

Nieder-molekulare Wirkstoffe werden aus eADF4(C16)-Partikeln sehr schnell ausgewaschen, und leicht neutrale Wirkstoffe weisen keine hohe Beladungseffizienz auf. Aus diesen Gründen wurde ein Komplex aus dem zytostatischen Wirkstoff Doxorubicin, welcher bereits Verwendung in der Chemotherapie findet, und einer Plasmid-DNA hergestellt, mit welchem eADF4(κ 16)-Partikel beladen wurden. Anschließend wurde die Wirkung der mit DNA und Doxorubicin beladenen Partikel auf HeLa-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Doxorubicin innerhalb der Zelle freigesetzt wird. Zusätzlich wurde der Effekt auch mit der Neuroblastoma-Zelllinie Kelly und Maus-Fibroblasten BALB/3T3 untersucht. Hier konnte eine

verringerte Zellviabilität detektiert werden, jedoch war der Effekt im Vergleich der DNA/Dox beladenen Partikeln zu freiem Doxorubicin in der gleichen Größenordnung.

Da die Beladung mit negativ geladener Nukleinsäure einen Einfluss auf die Aufnahme der eADF4(κ 16)-Partikel aufweist, wurden eADF4(C16), eADF4(C16)RGD und eADF4(C16)R₈G mit positiv geladenen Polyethylenimin als Modelwirkstoff beladen. Hier zeigte sich, dass die Aufnahme von eADF4(C16) und eADF4(C16)RGD-Partikeln durch die Beladung gesteigert werden konnte, nur die beladenen eADF4(C16)R₈G-Partikel wurden im Vergleich zu unbeladenen eADF4(C16)R₈G-Partikeln von HeLa-Zellen signifikant schlechter aufgenommen. Die Beladung der Partikel hat des Weiteren zur Folge, dass der Anteil der Makropinozytose bei der Aufnahme erhöht wird. Der Hauptaufnahme-Mechanismus bleibt jedoch die Clathrin-vermittelte Endozytose.

Summary

Spider silk is best known for its extraordinary mechanical properties, however, less well-known is that it is biocompatible and biodegradable. In fact, spider webs have been used as wounds coverings and fibers since the ancient times, meanwhile it was observed that this material does not cause an inflammation. Unfortunately, because of the territorial and cannibalistic behavior of spiders and the variations in silk quality, the natural material cannot be used for biomedical applications on a large scale. To solve this problem, spider silk proteins have been produced into recombinant forms using biotechnological techniques. These recombinant silk proteins can also be processed into a greater variety of morphologies than the natural spider silk, which in turn results in a broader range of technical and medical applications for this material.

The recombinant spider silk protein eADF4(C16) and variants thereof used in this work are based on the repetitive core sequence of the *Araneus diadematus* fibroin 4 (ADF4). This fibroin is one of the main components of the dragline silk of the European garden spider *A. diadematus*. In this work, particles produced of engineered ADF4 (eADF4(C16)) and variants thereof were used, where C represents a sequence module that is repeated 16 times.

Published work has demonstrated the application of spider silk particles as drug carriers due to their loading capacity of soluble and insoluble low molecular weight drugs or even small proteins. However, the cellular uptake of silk particles in general was low. In this work, different strategies were studied for enhancing cellular uptake of spider silk particles by adding cell penetrating peptides or changing charge of eADF4(C16) particles. Thereby, the uptake could be increased, and the underlying internalization mechanism was identified.

Therefore, three strategies were followed to enhance the interaction of spider silk particles with cells and to enhance their cellular uptake. The first strategy was to optimize the production of particles with smaller diameters and size distribution than previously produced, which was achieved by utilization of the ionic liquid 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate. Second, cell penetrating peptides (Tat-, R₈G-, RGD-peptide) were hybridized with eADF4(C16), since the physicochemical properties as well as cell-interacting motifs also play an important role in particle uptake. As a third strategy, the analysis of charge dependent cellular uptake was analyzed. Therefore the recombinant positively charged spider silk protein eADF4(κ16) was used. From all different proteins spherical particles could be fabricated. The uptake of eADF4(C16) by HeLa cells was low, but could be increased in the presence of cell penetrating

sequences or by changing the net-charge. The best internalization rate was obtained by using eADF4(κ 16) as well as eADF4(C16) R_8G particles. The underlying uptake mechanism could be identified as clathrin-mediated endocytosis by using endocytotic inhibitors. However, macropinocytosis also plays a role, depending on the particle type.

The impact of drug loading onto spider silk particles was also analyzed to evaluate its influence on cellular uptake and the uptake mechanism. Due to the positive charge of eADF4(κ 16) particles they can be used as gene carriers, and single stranded fluorescence labeled DNA (FI-ODN) was used as a model cargo. After DNA loading, the cellular uptake of particles decreased dramatically, however this could be minimized by coating the DNA-loaded particles with an additional layer of eADF4(κ 16).

Low molecular weight drugs rapidly diffuse out of eADF4(C16) particles and the loading of low-charged drugs is ineffective. Therefore, a complex of doxorubicin and plasmid DNA was used to load eADF4(κ 16) particles. It could be shown that doxorubicin is released within HeLa cells after particle uptake. Furthermore, this system was also tested for the neuroblastoma cell line Kelly and mouse fibroblasts BALB/3T3. Here, only at higher concentrations a decreased cell viability in the same range of free doxorubicin could be detected.

Since, loading of eADF4(κ 16) particles with negatively charged nucleic acids has an impact on particle cellular uptake, eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16) R_8G particles were loaded with the positively charged polyethylenimin. Here, the uptake could be increased in the case of eADF4(C16) and eADF4(C16)RGD particles, but the uptake of eADF4(C16) R_8G particles was dramatically decreased. Concerning the uptake mechanism, drug loading results in a higher contribution of macropinocytosis, but the main uptake route is still clathrin-mediated endocytosis.

1. Einleitung

1.1 Wirkstoffaufnahme in Geweben und Zellen

Unabhängig von der Applikationsart eines Wirkstoffes, muss der verabreichte Stoff in die Blutbahn oder das Lymphsystem des Organismus gelangen, um zum Wirkort transportiert werden zu können. Neben dem eigentlichen therapeutischen Effekt eines Wirkstoffs ist der Eintritt ins Verteilungssystem des Körpers sowie dessen Verlassen im Zielgewebe von entscheidender Bedeutung für den Behandlungserfolg, was die Arzneimittelwirkung zum Resultat diverser komplexer Vorgänge macht. Je nach den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Arzneistoffes, dem gewünschten Wirkungseintritt, der Wirkdauer, dem Wirkort und vor allem je nach Zustand des Patienten können verschiedenen Applikationsarten in Frage kommen, um eine optimale Wirkstoffverteilung im Körper zu erzielen (Tabelle 1).¹ Soll die Wirkung beispielsweise nur lokal auftreten und der Gesamtorganismus nicht beeinträchtigt werden, wird der Wirkstoff direkt in das Ziel-Gewebe injiziert. Für weitere therapeutische Ziele kommen andere Verabreichungsformen zum Einsatz.

Grundsätzlich müssen die aktiven Verbindungen in ausreichender Menge resorbiert werden und in Wechselwirkung mit den Zielmolekülen treten, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen.¹ Hierbei spielen die vier Eigenschaften Absorption, Verteilung (*distribution*), Metabolisierung und Exkretion (ADME-Eigenschaften) des Stoffes eine entscheidende Rolle. Um eine Wirkung im Körperinneren erzielen zu können, muss ein Arzneistoff, egal welche Verabreichungsrouten gewählt wird, meist diverse Zellschichten überwinden. Anschließend wird der Wirkstoff über das entsprechende Verteilungssystem an den Zielort transportiert, wo er sich z.B. durch die Bindung an Ziel-Liganden anreichert.² Oft ergeben sich bei diesem Schritt Probleme durch eine Bindung von Arzneistoffen an Nicht-Ziel-Liganden und einer hieraus resultierenden verminderten Bioverfügbarkeit der aktiven Verbindungen.

Tabelle 1: Applikationsarten, sowie deren Formulierungen mit ihren Vor- und Nachteilen.

Applikation	Formulierung	Vorteile	Nachteile	Beispiele
Oral ^{1, 3-6}	Flüssig (Lösungen, Säfte, Sirup, etc.)	Einfach herzustellen Dosis einfach anpassbar	Oft schlechte Resorbierbarkeit Irritationen der Magenschleimhaut	Schmerztabletten (Ibuprofen, Aspirin, etc.)
	Fest (Tabletten, Kapseln, Kaugummis, etc.)	Vom Patienten bevorzugt Einfach einnehmbar	Magensaft-resistente Überzüge erforderlich Dosis schwer bestimmbar Inkompatibilität mit Nahrungsmitteln Überdosierung leicht möglich	Hormonpräparate (Schilddrüsenpräparate, Kontrazeptiva) Antibiotika Globuli
Parenteral ^{1, 3-10}	Injektionen (intravenös, intramuskulär, intrakardial, etc.)	Hauptroute für Neugeborene oder Notfallversorgung Schneller Wirkeintritt Hohe Dosis sofort im Blutkreislauf	Gefahr von Infektionen, Überdosierung, Embolien Notwendigkeit der Isotonie und Isohydrie	Schmerzmittel wie Morphin Antibiotika
Rektal ^{1, 3-6}	Zäpfchen rektale Flüssigkeitszufuhr	Bei allen Patienten anwendbar (vor allem bei Schluckproblemen)	Limitierte Bioverfügbarkeit Niedrige Resorptionsquote	Fibersenkende Zäpfchen
Transdermal, topisch ^{1, 3-5}	Pflaster Creme Gel Flüssigkeiten	Konstantes Wirkstofflevel im Blut über gewissen Zeitraum	Ungewollte Verabreichung Natürliche Barriere für viele Wirkstoffe Lokale Hautirritationen	Schmerz-pflaster Hautcremes Schmerzgele
Nasal ^{1, 3-5}	Tropfen Salben Sprays	Gute nasale transmukosale Bioverfügbarkeit Nadelfreie Verabreichung	Unerwünschte systemische Effekte möglich z.B. Irritation der Mukosa Sekretion	Nasensprays
Pulmonal ^{1, 3-5}	Sprays Inhalatoren	Schmerzfremde Verabreichung	Anreicherung in Atemwegen Kritisch bei Dosiserhöhung	Asthma-Sprays Pulver-inhalatoren

Bei allen Verabreichungsarten muss mindestens eine Zellschicht überwunden werden (z.B. Endothelschicht der Blutgefäße bei intravenösen Injektionen, Haut oder Schleimhäute bei Applikation über Cremes oder bei oraler/nasaler/rektaler/pulmonaler Verabreichung). Diese erste Zellschicht stellt somit auch die erste Barriere dar, die ein Wirkstoff durchdringen muss. Die Passage dieser Barriere kann dabei grundsätzlich über drei Wege (intrazellulär, parazellulär, transappendageal) erfolgen. Bei der Aufnahme aktiver Verbindungen über die intrazelluläre Route, werden die Zellen selbst (Membranen und Cytoplasma) durch die aktiven Verbindungen passiert. Erfolgt die Wirkstoffaufnahme hingegen über den parazellulären Weg, so bewegt sich der Arzneistoff in den durch zahlreiche Proteine und Lipide charakterisierten Räumen zwischen den Zellen und durchdringt auf diese Weise die Zellbarriere. Der transappendageale Weg beschreibt die Aufnahme über Schweißdrüsen oder Haarfollikel. Wirkstoffe, die über diesen Weg aufgenommen werden, weisen häufig ein hohes Molekulargewicht und eine hohe Nettoladung auf.¹¹ Egal welcher Weg eingeschlagen wird, die Beschaffenheit der Haut oder Schleimhäute sowie die Eigenschaften der Wirkstoffe beeinflussen die Aufnahme dramatisch. Zum einen spielen physiologische Faktoren wie das Hautalter, da sich Struktur, Funktion und Wassergehalt der Haut durch Alterung verändert,¹² die Aktivität von Enzymen sowie Durchblutung eine wichtige Rolle.¹¹ Auch der Hauttyp¹³ (Lipidgehalt, intrazelluläre Kohäsionsraten¹⁴, etc.) die Temperatur^{11, 15}, der Wassergehalt¹⁶, sowie der Zustand der Haut^{11, 17, 18} haben einen großen Einfluss. Zum anderen sind physikochemische Faktoren der Haut und des Wirkstoffes wichtig. So stellt die Wirkstoffkonzentration einen limitierenden Faktor dar, wenn der Wirkstoff in die Haut eindringt.¹⁹ Auch weitere Faktoren wie pH-Wert, Molekulargewicht oder die Fähigkeit des Wirkstoffs Wasserstoffbrücken auszubilden, spielen für eine optimale Permeation eine wichtige Rolle.

Auch bei der oralen Applikation, bei welcher Wirkstoffe in Tablettenform oder verpackt in Kapseln aus z.B. Gelatine verabreicht werden, muss eine Zellbarriere überwunden werden, in diesem Fall die intestinale Mukosa (Darmschleimhaut). Wie bei der Aufnahme über die Haut, kann der Wirkstoff durch die Zelle (intrazellulär oder transzellulär) oder zwischen den Zellen (parazellulär) wandern (Abbildung 1). Die Passage zwischen benachbarten Zellen wird in der Regel jedoch durch *tight junctions* verhindert und ist somit für viele Wirkstoffe, besonders für Proteine oder Peptide, blockiert.^{20, 21} Des Weiteren können Stoffe auch über M-Zellen der Peyer-Plaques aufgenommen werden.²² Peyer-Plaques sind Ansammlungen von Lymphfollikeln, gehören somit zum Lymphsystem, und nehmen eine wichtige Funktion bei der erworbenen Immunantwort und der Infektionsabwehr im Darm ein.

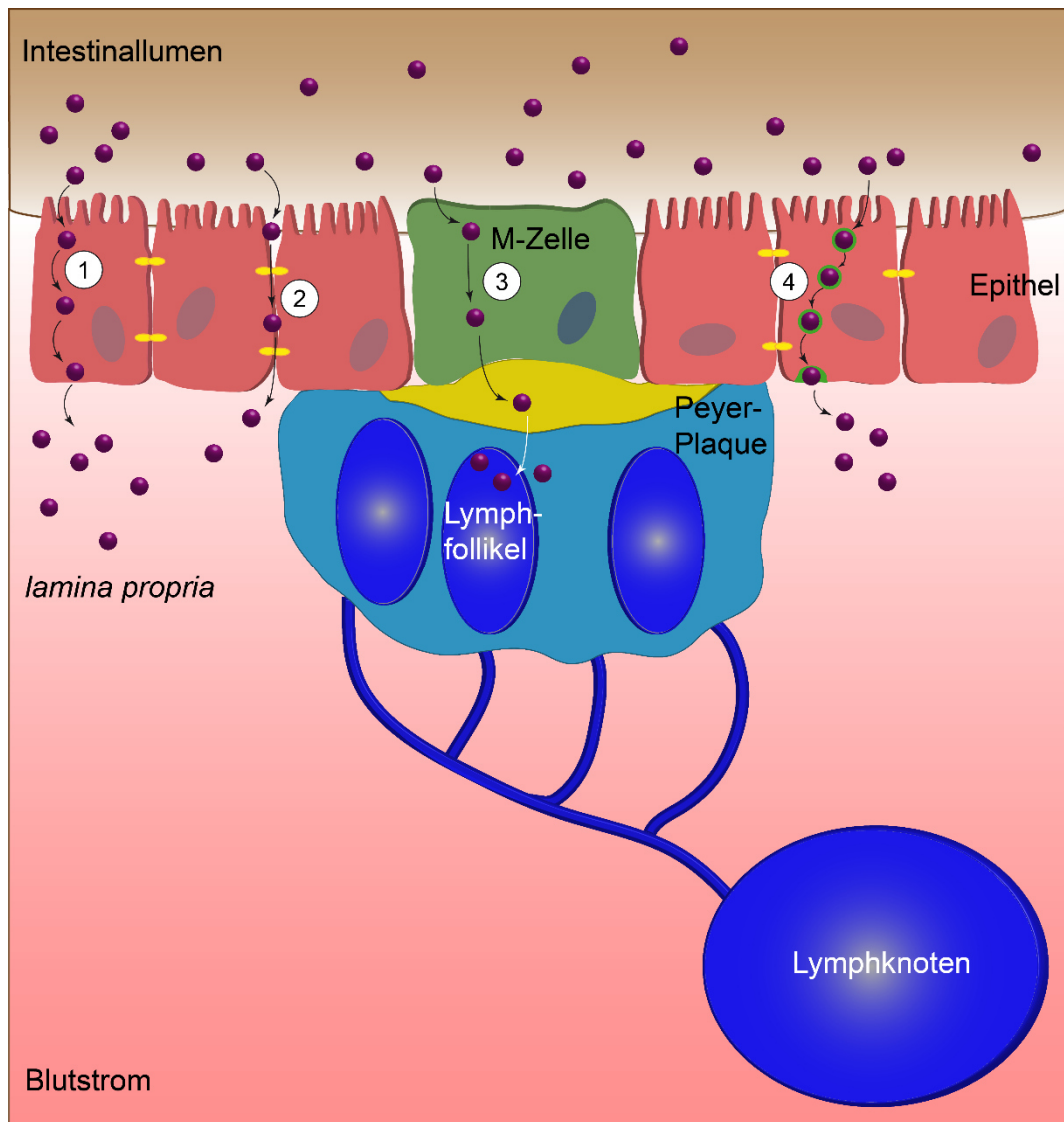


Abbildung 1: Verschiedene Aufnahmewege über die intestinale Mukosa. (1) transzelluläre Route mittels passiver Diffusion; (2) parazelluläre Route; (3) Aufnahme über M-Zelle zur Peyer-Plaques und somit in das Lymphsystem; (4) transzelluläre Route: z.B. über Carrier- oder Rezeptor-vermittelte Endozytose. *tight junctions*: gelb.

Bei einer intravenösen Verabreichung muss der Wirkstoff die Epithelzellen der Gefäßwände überwinden, um ins Zielgewebe zu gelangen. Auch dies kann auf den bereits beschriebenen Wegen erfolgen. Bei Tumorgewebe ist die Lücke zwischen den Zellen der Blutgefäßwand jedoch größer als bei gesundem Gewebe, was eine erhöhte Permeabilität und Retention, kurz EPR-Effekt (engl. *enhanced permeability and retention*) zur Folge hat.²³ Dabei können Wirkstoffe, Liposomen und Partikel im Vergleich zu normalem Gewebe einfacher über die Blutbahn ins Tumorgewebe aufgenommen werden.

Für eine optimale Wirkung muss ein Wirkstoff in ausreichend hoher Konzentration im Zielgewebe vorliegen. Zu einer Reduktion der Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes kann u.a. dessen Metabolisierung beitragen. Eine Inaktivierung oder Beseitigung von Wirkstoffen erfolgt

meist über Leber und Nieren und endet u.a. in der Ausscheidung der Endprodukte mit dem Urin. Ein Wirkstoff, der stark metabolisiert wird, muss somit in hoher Dosis verabreicht werden, um das therapeutische Level zu erreichen bzw. halten zu können. Biochemisch verläuft die Metabolisierung von Wirkstoffen hauptsächlich über Konjugation und Oxidation. Bei der Konjugation werden organismuseigene, meist sehr gut wasserlösliche Gruppen wie z.B. Glucuronsäure, Acyl- oder Acetylreste an die Wirkstoffe angefügt um deren Wasserlöslichkeit zu erhöhen und somit die Ausscheidung zu erleichtern. Auch die Oxidation eines Stoffes kann dessen Wasserlöslichkeit steigern und so zu einem schnellen Abtransport des Wirkstoffes im Organismus beitragen.² Hierdurch werden auch funktionelle Gruppen für spätere Stoffwechselschritte eingebracht. So wird beispielsweise der Wirkstoff Ibuprofen durch das Enzym Cytochrom-P₄₅₀ in der Leber oxidiert.²⁴⁻²⁶

Das Problem einer schlechten Bioverfügbarkeit therapeutisch eingesetzter Verbindungen ist vor allem bei der Chemotherapie zu verzeichnen. Hier kann der Fall eintreten, dass ein Wirkstoff zwar in ausreichender Menge vorhanden ist, eine sichtbare Wirkung jedoch ausbleibt. Dies liegt oft an der Ausbildung von Wirkstoff-Resistenzen durch die Tumorzellen. Meist wird dabei der Wirkstoff wieder aktiv aus dem Zellinneren transportiert. Aber auch andere Mechanismen zur Entwicklung einer Wirkstoff-Resistenz sind möglich, sowie die Ausbildung mehrerer Resistenz-Mechanismen gleichzeitig (Multiple Wirkstoff-Resistenzen). Bei Krebstherapien stellt dieser Effekt ein großes Problem dar, da bei der Ausbildung mehrerer Resistenzen eine effektive Therapie oft unmöglich wird.

1.1.1 Multiple Wirkstoff-Resistenzen (MDR)

Viele Tumorarten sind resistent gegen herkömmliche Arten der Chemotherapie oder können eine Resistenz während der Behandlung entwickeln. In der Tumorforschung wurden diverse Wege der Resistenzbildung aufgeklärt, jedoch konnten keine höheren Erfolgsraten bei der Behandlung aufgrund dieser Erkenntnisse gewonnen werden.²⁷⁻²⁹ Es gibt verschiedenste Wege wie eine Tumorzelle zu einem Resistenz-Mechanismus gelangt. In der Zellmembran befinden sich Efflux-Pumpen, die primär dafür zuständig sind, toxische Stoffe aus der Zelle zu befördern und diese so vor einer Vergiftung zu schützen.³⁰⁻³² Der bekannteste derartige Transporter ist das P-Glykoprotein, auch bekannt als Multi-Wirkstoff-Resistenz Protein 1 (MDR1), und gehört zur Familie der ABC-Transporter.³³ In Tumorzellen wird die Expression dieses Transporters erhöht, was in einem Anstieg des Abtransports eines therapeutisch eingesetzten Zytostatikums aus der Zelle resultiert.³⁴

Neben Efflux-Pumpen werden auch andere Oberflächenproteine wie Rezeptoren oder Trägerproteine vermehrt bzw. vermindert produziert, was zur Ausbildung von Resistenzen führen kann. Die Veränderung der Zusammensetzung der Oberflächenproteine der Zellmembran kann zusätzlich eine Änderung der Signalweiterleitung hervorrufen. So können Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, bei welchen die Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Integrine, eine wichtige Rolle spielen, zur Überexpression von apoptotischen Faktoren führen, wodurch die Fähigkeit zur Apoptose vermindert wird.^{35, 36} Zusätzlich kann sowohl die Expression von Ziel-Liganden des eingesetzten Wirkstoffes als auch die Kapazitäten zur DNA Reparatur erhöht werden.^{34, 37, 38}

Des Weiteren spielen pH- und pO₂-Wert im Tumorgewebe eine wichtige Rolle bei der Therapie. Der saure extrazelluläre pH beschränkt die Aufnahme von schwach-basischen Wirkstoffen wie z.B. Doxorubicin oder Adriamycin.³⁴ Durch eine Hypoxie wird in Tumorzellen die Expression von MDR-verknüpften Genen, wie der ABC-Transporter, oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *hypoxia inducible factor1* (HIF-1), eingeleitet.³⁹ Dies führt nicht nur zur Ausbildung von Multiple Wirkstoff-Resistenzen, sondern auch zur Entwicklung von Metastasen und somit zur Ausbreitung des Tumors.

Da der Resistenzbildung eine Vielzahl an Mechanismen zugrunde liegen, müssen Strategien für eine Therapie entwickelt werden, die die Ausbildung solcher Resistenzen verhindern.

1.1.2 Strategien zur Überwindung der Multiplen Wirkstoff-Resistenzen

Während der Chemotherapie werden Zytostatika verabreicht, um das Wiederauftreten oder Wachstum eines bereits existenten Tumors zu unterbinden. Hierbei werden Kombinationen unterschiedlicher Arzneimittel mit verschiedenen Wirkmechanismen und Zielorten eingesetzt, die die Ausbildung von MDR verhindern sollen. Die Effektivität der Behandlung muss dabei stets mit den oft erheblichen Nebenwirkungen abgeglichen werden.

Da viele MDR auf MDR-assoziierte Genexpressionen zurückzuführen sind, können zur Behandlung *short interfering RNA* (siRNA) oder RNA Interferenz (RNAi) eingesetzt werden. Dabei assembliert z.B. die siRNA mit der Endoribonuklease innerhalb der Zelle zu einem RNA-induzierten *silencing* Komplex (RISCs), der komplementäre RNA Fragmente binden, zerschneiden und dadurch inaktivieren kann. Ein erfolgreicher Einsatz dieser Methode unter Verwendung von *antisense* Oligonukleotiden, katalytischer RNA und siRNA gegen P-Glykoprotein, Multi-Resistenz Protein (MDP) oder gegen das Brustkrebs-Resistenzprotein (BCRP) konnte bereits beschrieben werden.⁴⁰⁻⁴³ Auch siRNA beladene Nanopartikel sowie Antikörper-basierte Behandlungsmethoden können, gegen eine MDR, Wirkung zeigen.⁴⁴⁻⁴⁶

Die Überwindung der MDR oder gar eine Verhinderung der Entstehung der MDR kann unter Einsatz von neuartigen Wirkstoffen erfolgen, die nicht, wie die meisten bisherigen Wirkstoffe, vom P-Glykoprotein erkannt werden. Diese neuartigen Verbindungen zeigen eine höhere zytotoxische Wirkung im Vergleich zu den herkömmlich eingesetzten Medikamenten.⁴⁷⁻⁴⁹ Eine weitere mögliche Steigerung der Wirkstoffwirkung sowie Verhinderung der Ausbildung von MDR kann durch das Verpacken von Wirkstoffen erreicht werden (Wirkstofftransportsysteme). Durch die Verpackung in z.B. Kapseln oder Partikel wird zum einen der Wirkstoff vor der Metabolisierung und somit dem frühzeitigen Abbau geschützt, und zum anderen die benötigte Konzentration erniedrigt, da der Wirkstoff erst direkt am Tumor oder nach endozytotischer Aufnahme innerhalb einer Tumorzelle freigesetzt wird. Dadurch können auch viele Nebenwirkungen verringert, und so die Lebensqualität für den Patienten erheblich gesteigert werden.

1.2 Einsatzbereich des gezielten Wirkstofftransports

Die gängige Medikation erfolgt heutzutage meist oral oder intravenös, sodass die Wirkstoffaufnahme und -verteilung über den Darm oder die Blutbahn erfolgt. Bei beiden Verabreichungsarten wird der Wirkstoff im Organismus verteilt und nur ein geringer Teil gelangt an den vorbestimmten Wirkort. Der verabreichte Wirkstoff kann seine Wirkung erst ab einer bestimmten Konzentration (therapeutisches Fenster) entfalten, wodurch oft hohe Dosen verabreicht werden müssen.⁵⁰ Gleichzeitig sinkt jedoch die Wirkstoffkonzentration im Zielbereich, bedingt durch Metabolisierung oder Ausscheidung der aktiven Verbindung, auch schnell wieder ab, sodass die therapeutisch wirksame Dosis nur über einen geringen Zeitraum erreicht wird. Zu hohe Wirkstoffkonzentrationen gilt es dringend zu vermeiden, da das therapeutische Fenster meist nahe an der toxischen Dosis des Stoffes liegt (Abbildung 2).⁵⁰ Bei schweren Krankheiten, wie z.B. Krebs, ist es notwendig die Wirkstoffkonzentration über einen langen Zeitraum im therapeutischen Fenster zu halten, da sonst keine ausreichende Wirkung eintritt. Mit herkömmlichen Verabreichungsmethoden ist dies nur sehr schwer bis gar nicht möglich. Unter Verwendung gezielter Wirkstofftransportsysteme (*targeted drug delivery systems*) soll diese Problematik behoben werden. Voraussetzung dieser selektiven Verabreichung ist, dass das Transportsystem im Organismus zum Zielgewebe gelangt. Ermöglicht werden kann dies durch die Verwendung von Signalmolekülen bzw. spezifischen Erkennungssequenzen für Rezeptoren, die selektiv für Tumorgewebe sind. Gleichzeitig muss auch die Kontrolle der Wirkstofffreisetzung (*controlled drug release*) vor Ort gewährleistet

sein. Durch eine langsame und kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes im Zielgewebe kann dessen Wirkung länger anhalten. Da hierdurch insgesamt geringere Wirkstoffmengen bereits eine ausreichende Wirkung hervorrufen, können auch unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden.

Es muss jedoch stets sichergestellt werden, dass das Trägermaterial biokompatibel ist und den Wirkstoff ausreichend aufnimmt bzw. wieder freisetzt. Optimal wäre hierbei, eine Freisetzung des Wirkstoffs erst innerhalb der Tumorzelle. Dazu muss das System jedoch zunächst von den Zielzellen z.B. über Mechanismen der Endozytose aufgenommen werden.

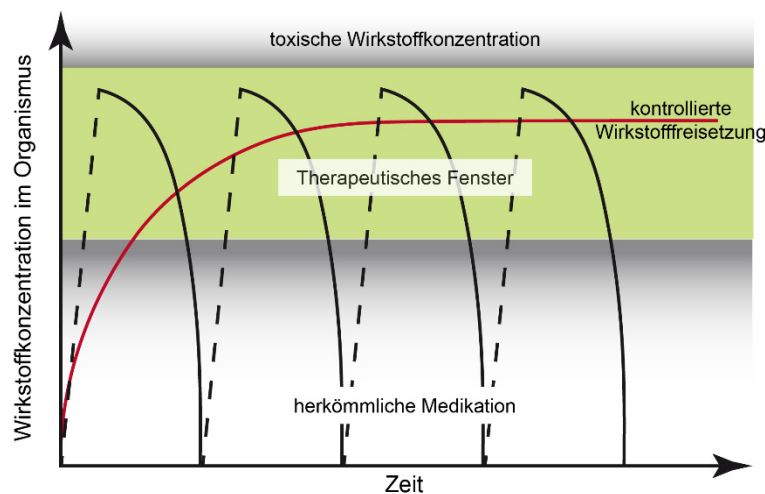


Abbildung 2: Schema der Wirkstoff-Konzentration einer therapeutischen Verabreichung per Injektion (schwarze Kurve) und mittels kontrolliertem Wirkstofffreisetzungssystem (rote Kurve) (modifiziert nach Ref. 50).

1.3 Mechanismen der Endozytose

Zellen können über verschiedene Wege mit ihrer Umgebung wechselwirken und Moleküle (z.B. Nährstoffe) aufnehmen. Viele kleinere Moleküle können die Zellmembran selbstständig via Diffusion, passiven Transport durch Membrankanäle oder gebunden an Carrier-Proteine passieren. Können die passiven Transportwege nicht genutzt werden, so können die Moleküle nur unter Energieaufwand mittels aktiven Transports ins Innere der Zelle befördert werden. Moleküle, die die Zellmembran nicht überwinden oder über Membrankanäle ins Zellinnere gelangen können, werden meist endozytotisch aufgenommen. Als Endozytose wird im Allgemeinen eine Einstülpung der Plasmamembran mit anschließender Abschnürung des Einschlusses ins Zellinnere bezeichnet, wobei Membranproteine, Lipide, integrierte Proteine und extrazelluläre Flüssigkeit etc. einverleibt werden. Dieser Vorgang ist hoch reguliert,

dynamisch und spielt neben der Aufnahme von Nährstoffen auch eine Schlüsselrolle bei Prozessen wie der Antigenpräsentation, Zellmigration, Zelladhäsion, Zellproliferation und der Regulation von Signalkaskaden.⁵¹ Es gibt verschiedenste Mechanismen über welche eine Zelle Endozytose betreiben kann. Die bekanntesten und auch am besten untersuchten Mechanismen sind die Clathrin- und Caveolar- (Lipid-Raft)-vermittelte Endozytose sowie die Makropinozytose (Abbildung 3). Neben diesen drei Mechanismen existieren Clathrin-/Caveolar-unabhängige, oft auf spezielle Ereignisse angepasste Mechanismen wie z.B. Clathrin-unabhängige Carrier und GPI-reiche frühe endosomalähnliche Kompartiment (CLIC/GEEC)-artige Endozytose oder Entosis.⁵²

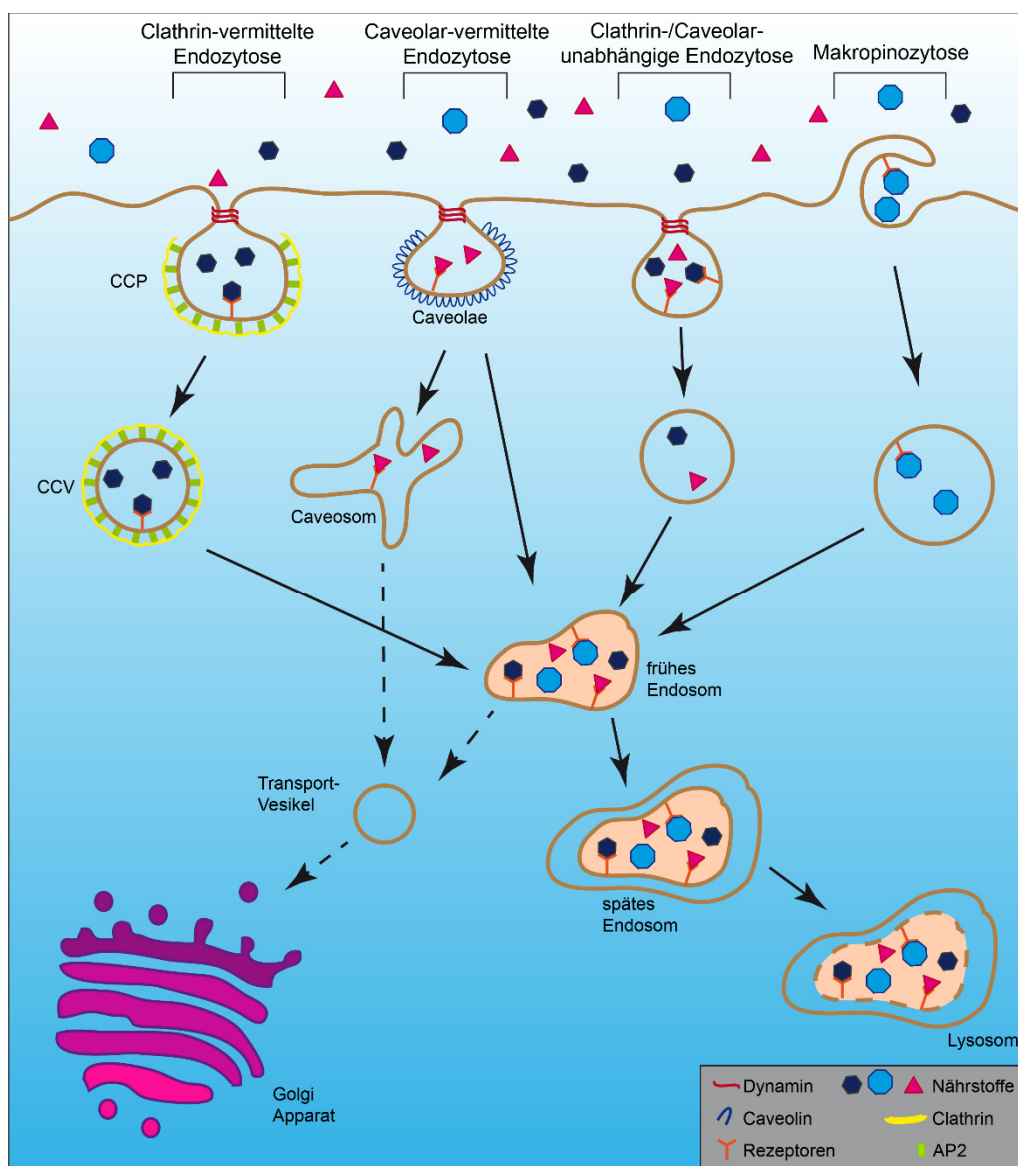


Abbildung 3: Mechanismen der Endozytose. Abgebildet sind die bisher am besten untersuchten Endozytose-Mechanismen sowie gängige Wege endozytotischer Vesikel. CCP: Clathrin-beschichtete Vertiefung (*clathrin coated pit*); CCV: Clathrin-beschichteter Vesikel (*clathrin coated vesicle*)

1.3.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Der am besten untersuchte Mechanismus der Endozytose ist die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME). Die endozytotischen Vesikel, die sich von der Plasmamembran abschnüren, sind hierbei mit dem Protein Clathrin beschichtet. Dieser Weg spielt bei vielen Vorgängen in der Zelle wie z.B. der inter- und intrazellulären Signalübertragung, dem Membranrecycling und der Aufnahme von Membranrezeptoren eine kritische Rolle. Dabei ist das Zusammenspiel von vielen Faktoren wie der Koordination, der Assemblierung von Proteinen an der Plasmamembran und der zeitliche Ablauf extrem wichtig.^{53, 54} Clathrin besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten,^{55, 56} wobei die schwere Kette am Aminoterminal eine β -Propeller-Domäne trägt. Der Carboxyterminus der schweren Kette ist für die Interaktion der schweren Ketten untereinander verantwortlich und weist kaum eine definierte Struktur auf.⁵⁷ Jedoch befindet sich am Carboxyterminus eine Erkennungssequenz für das Hitzeschockprotein 70 (Hsc70), welches für die Entmantelung des Vesikels von Clathrin nach Abschluss der Vesikelbindung benötigt wird.^{58, 59} Die schwere Kette wird in ein proximales Segment, Knie, distales Segment, Anker, Linker und die aminoterminal β -Propeller-Domäne aufgeteilt. Das proximale Segment, Knie, distale Segment und der Anker bilden eine Super-Helix aus, die ein leicht gekrümmtes „Bein“ des Clathrin-Dreibeins bildet. Das proximale Segment interagiert des Weiteren auch mit der leichten Kette, die vermutlich für die Bildung und Auflösung der Vesikel-Ummantelung verantwortlich ist. Die gesamte Struktur wird als Triskelion bezeichnet (Abbildung 4A).

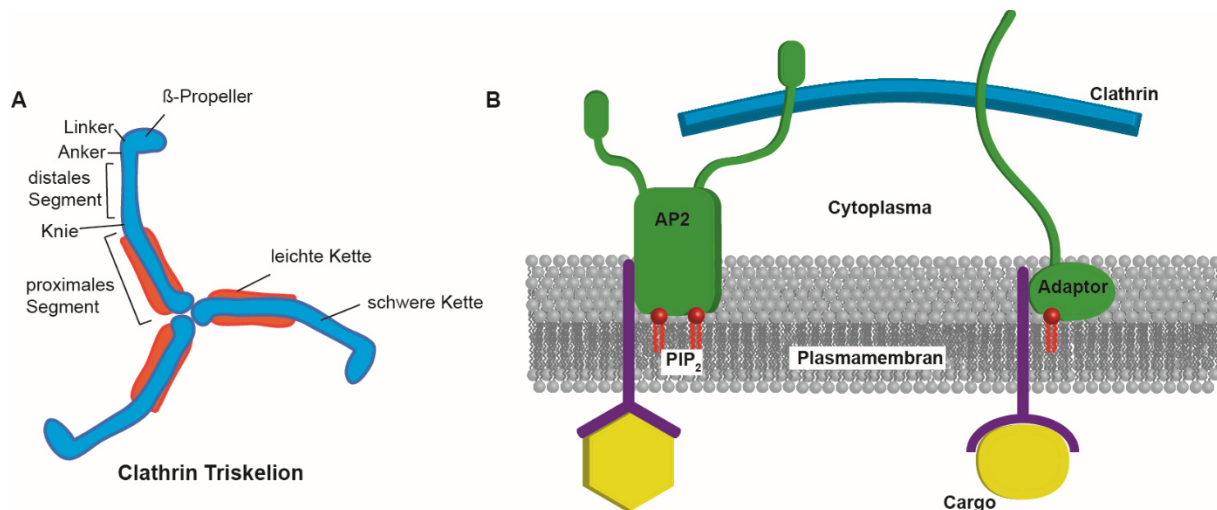


Abbildung 4: Clathrin Triskelion Struktur (A) sowie die Schlüsselfaktoren der Initiation der Clathrin-vermittelten Endozytose (B). (A) Das Clathrin Triskelion besteht aus je drei leichten und schweren Ketten, die sich zu einem Dreieck zusammenfügen. Die schwere Kette wird aus dem proximalen Segment, Knie, distalen Segment sowie einem Ankerbereich und einem Linker zur β-Propeller-Domäne gebildet. (B) Schlüsselfaktoren der Initiation der Clathrin-vermittelten Endozytose, wie das Adaptor-Protein AP2, interagieren mit dem Membranlipid PIP₂ und Rezeptoren, die ein definiertes Cargo-Molekül gebunden haben. Durch die Rekrutierung weiterer Adaptor-Proteine können zusätzliche Clathrin-Moleküle gebunden werden, sodass sich eine Clathrin-Hülle und eine Mulde in der Plasmamembran bilden.

Da Clathrin selbst nicht direkt an die Membran binden kann, benötigt es für die Bindung Adaptor-Proteine. Das wichtigste Adaptor-Protein ist das Adaptor-Protein 2 (AP2), welches die Rolle eines Master-Initiators der CME innehat, da es neben Clathrin auch andere Proteine wie z.B. den LDL-Rezeptor rekrutiert (Abbildung 4B).⁶⁰⁻⁶² Die Adaptor-Proteine interagieren mit dem Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphat (PIP₂) und binden so an die Zellmembran. Anschließend rekrutieren die Adaptoren neben Clathrin weitere Adaptoren oder Komponenten mittels ihrer zwei-lappigen Anhangs-Domänen.⁶³⁻⁶⁷ Zusätzliche Faktoren (wie nicht strukturelle Bestandteile), die die Bindung von AP2 an PIP₂ stabilisieren, erhöhen die Initiation, wodurch Clathrin-beschichtete Mulden entstehen. Die Initiation der Partikelbildung erfolgt in der Regel durch zwei AP2, manchmal auch durch vier AP2 Moleküle.⁶⁸ Zusätzlich erhöht die Anwesenheit eines AP2 Proteins die Wahrscheinlichkeit, dass weitere AP2 an dieser Stelle andocken und Clathrin Triskelien rekrutieren, bevor die ersten wieder dissoziieren. Andere Komponenten, die durch die Adaptor-Proteine rekrutiert werden, wie die endozytotisch assoziierten Proteine, gewährleisten u.a. eine effiziente Beschichtung, Ausbildung der Mulde, sowie eine schnelle Beschichtungs-Deassemblierung nach Abschnüren des Vesikels.^{69, 70}

An der durch die Initiation entstehenden Mulde assemblieren die Clathrin Triskelien in einer Gitterstruktur, wobei deren Ausbildung größtenteils pentagonal und hexagonal erfolgt, und so eine fußballartige Struktur entsteht. Die Geometrie ist in allen Bereichen konserviert, da nur dadurch eine Interaktion mit z.B. Adaptor-Proteinen, Hsc70 oder anderen Membran-Interaktions-Komponenten gewährleistet werden kann.⁷¹⁻⁷⁴ Die Clathrin Gitterstruktur deformiert die Membran bei der Anlagerung so stark, dass sich die Membran einstülpt, abschließt und schließlich ein Vesikel abgeschnürt wird.

Die Abschnürung des Vesikels von der Membran wird letztendlich durch das Protein Dynamin unter Energieaufwand in Form von GTP-Hydrolyse vermittelt. Nach der Vesikel-Bildung ist dieser zunächst noch über eine Art Stiel mit der Zellmembran verbunden. Die Abspaltung des Vesikels von der Plasmamembran wird durch die Dimerisierung von Dynamin initiiert, wobei sich anschließend die Dimere zu Tetrameren zusammenfügen. Dynamin besitzt eine GTPase-Domäne, die GTP in der Nähe des Dimerisierungszentrums binden kann. Die Dimerisierung steuert die Hydrolyse des GTPs und die Ausbildung helikaler Strukturen.^{75, 76} Auf diese Weise wird um den Membranstiel, den der Vesikel mit der Membran verbindet, ein Kragen gebildet. Die Hydrolyse von GTP ist dabei mit Konformationsänderungen im Bereich der GTPase-Domäne und der α -helikalen Bereiche gekoppelt. Der Effekt der beiden Änderungen wirkt sowohl auf die Orientierung des Stiels als auch auf die Organisation des Kragens und forciert so eine Abspaltung des Vesikels.

Die für die einzelnen Schritte notwendigen Proteine sind nur zum Zeitpunkt ihrer Aufgabe am entstehenden Vesikel vorhanden. So wird beispielsweise das für die Abschnürung des Vesikels von der Membran verantwortliche Dynamin erst nach der vollendeten Membraneinstülpung rekrutiert.

Die Interaktion oder Beladung der Vesikel mit Cargos erfolgt ebenfalls über Adaptor-Proteine, beispielsweise über die Bindung von Rezeptoren für Transferrin an AP2. Der wohl bekannteste membrangebundene Rezeptor, der LDL-Rezeptor, bindet zuerst an andere Proteine (ARH oder Dab2), die wiederum mit AP2 interagieren. Die Rezeptoren mit gebundenem Cargo bewegen sich anschließend in der Zellmembran bis sie auf eine Assemblierung eines Clathrin-Netzes treffen.^{77, 78}

Der Verlust der Clathrin-Beschichtung des Vesikels erfolgt sehr schnell nach dessen Abschnürung von der Plasmamembran und wird durch Hsc70 ausgelöst.^{77, 79-82} Hsc70 fungiert als molekulare Pinzette, die hydrophobe Peptide greifen kann und diese exponiert.⁸³ Durch die Hydrolyse von ATP strafft sich die Pinzette, durch den anschließenden Austausch von ADP

durch ATP wird die Pinzette geöffnet und das gebundene Peptid freigesetzt. Auf diese Art und Weise wird die Beschichtung vollständig vom Vesikel gelöst.

Während der Endozytose können sich um den entstehenden Vesikel Aktinfilamente bilden, die die Abschnürung begünstigen.^{84, 85} Die Rolle des Aktins bei der Vesikel-Abtrennung von der Zellmembran wird u.a. dadurch deutlich, dass das Aktin-Level zum Zeitpunkt der Abschnürung in der Umgebung des Vesikels am höchsten ist.⁸⁰ Über Adaptor-Proteine oder auch direkt können Motorproteine wie das Myosin V mit dem Vesikel interagieren und diesen entlang der Aktinfilamente transportieren, sodass der Vesikel ein bereits bestehendes Endosom erreichen oder mit anderen Vesikeln zu einem frühen Endosom verschmelzen kann.

1.3.2 Caveolae-vermittelte Endozytose

Neben der Clathrin-vermittelten Endozytose existieren auch Mechanismen, die keine oder eine alternative Proteinbeschichtungen der Vesikel aufweisen, wie die Caveolae-vermittelte Endozytose (oft auch *lipid raft* Endozytose genannt). Caveolae sind Plasmamembran-Einstülpungen mit einer Größe zwischen 50-80 nm.⁸⁶ Über diesen Weg werden Substanzen wie beispielsweise Folsäure oder Albumin aufgenommen und Membrankomponenten recycelt. Auch bei der Transzytose, der Signaltransduktion^{87, 88}, sowie der Onkogenese⁸⁹ spielt die Caveolae-vermittelte Endozytose eine wichtige Rolle. Die Caveolae Struktur besteht aus diversen Lipiden wie, Sphingolipiden, Cholesterol und zahlreichen Proteinen. Das charakteristischste Protein stellt hierbei das Caveolin (Cav) dar, das in einer Caveola bis zu 144 mal enthalten sein kann.⁹⁰ Es gibt drei homologe Cav Proteine (Cav1-3), dabei sind Cav1 und Cav2 primär in nicht muskulären Zellen, und Cav3 hauptsächlich in Skelettmuskelzellen und Zellen der glatten Muskulatur zu finden.^{91, 92} Cav-Proteine weisen eine lange *hairpin* Intramembran-Domäne auf, wobei der Amino- oder Carboxylterminus in das Cytoplasma hineinragt. Der Carboxylterminus ist palmitoyliert, wodurch das Protein zusätzlich an der Membran verankert wird.⁹³ Cav1 kann darüber hinaus mit ein bis zwei Cholesterin-Molekülen interagieren und so die Caveolae Struktur stabilisieren.^{94 95, 96}

Der genaue Mechanismus der Caveolae-Bildung und die Einzelschritte der Initiation sind bisher weitgehend unbekannt. Substanzen, die aufgenommen werden sollen, interagieren mit verschiedenen Lipiden der Plasmamembran und scheiden sich in kleinen Caveolae Vesikeln ab. Ein besonderes Merkmal der Caveolae ist die höhere Dichte an Lipiden im Vergleich zu anderen Bereichen der Plasmamembran. Caveolae repräsentieren eine spezialisierte, morphologisch ausgeprägte Sphingolipid-Cholesterol-Mikrodomäne.⁹⁷ Glycosphingolipide bilden Cluster, die u.a. die Aufnahme von bestimmten Rezeptoren wie Integrine stimulieren.

Die Caveolae können mit anderen Vesikeln zu Caveosomen oder frühen Endosomen fusionieren. Die Abschnürung erfolgt wie bei der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Dynamin.

Nicht nur Integrine, sondern auch viele andere Moleküle, die in der Signaltransduktion involviert sind, sind mit Caveolae assoziiert.⁹⁸ Auch eine Rolle bei der Mechanosensorik und der Zelladhäsion konnte der Caveolae-vermittelten Endozytose zugeordnet werden.⁹⁹⁻¹⁰¹

1.3.3 Makropinozytose

Makropinozytose ist ein zellulärer Prozess, der Zellen die Aufnahme großer Mengen an Makromolekülen ermöglicht. Dieser Prozess kann durch die Stimulation eines Mediators wie z.B. Wachstumsfaktoren, Interleukin-4 oder Phorbol ester erfolgen.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Aufgrund der starken Ähnlichkeit zur Phagocytose ist die Aufklärung der involvierten Prozesse schwierig. Der Makropinozytose konnten bisher Rollen bei verschiedensten Zellprozessen wie Zellmigration, Antigen-Präsentation, Immunreaktion und der Kontrolle der Aktivierung von diversen Signalmolekülen nachgewiesen werden.¹⁰⁵ Die Bildung der Einstülpung wird durch die Assemblierung von Aktin an der Membran hervorgerufen, wodurch diese in die Länge gezogen und so nach innen in die Zelle erweitert wird. Dadurch entstehen Aktin-assoziierte Plasmamembran-Einstülpungen ($\geq 1 \mu\text{m}$), welche entweder wie bei CME oder der Caveolae-vermittelten Endozytose durch Dynamin oder aber durch die hohen Zugkräfte der Aktinfilamente abgespalten werden.¹⁰⁶ Die Initiation der Aktinpolymerisation erfolgt durch Proteine der Familie der Rho-GTPasen, welche mit PIP_2 interagieren. PIP_2 und Rho wechselwirken mit weiteren Proteinen, und setzen so eine Kaskade von Protein und Lipidinteraktionen in Gang, wodurch die Aktinpolymerisation initiiert und weitergeführt wird.¹⁰⁷ Je nach Zelltyp werden die Makropinosomen in frühe Endosomen, anschließend späte Endosomen und schließlich in Lysosomen umgewandelt (z.B. in Makrophagen) oder fusionieren wieder mit der Plasmamembran.^{103, 108, 109} Der Regulierungsmechanismus ist nach wie vor nicht vollständig verstanden. Wichtige Schlüsselrollen spielen neben PIP_2 und Rho auch die Rac-abhängige Kinase PAK1 ¹¹⁰, Phosphoinositol-3- Kinase^{111, 112}, und verschiedene Rab-Proteine (z.B. Rab5 ¹¹³, Rab34 ¹¹⁴). Auch Cholesterol ist in diesem Prozess involviert, und wird für die Rekrutierung von aktiviertem Rac1 benötigt.¹¹⁵

Mittels der drei beschriebenen endozytotischen Aufnahmewege können Wirkstoff-transportsysteme aufgenommen werden. Dabei spielt die Art des gewählten Transportsystems eine wichtige Rolle.

1.4 Kontrollierter Wirkstofftransport

1.4.1 Partikuläre Wirkstofftransportsysteme

Bei kontrolliertem Wirkstofftransport werden (mobile oder stationäre) Systeme eingesetzt, die den Wirkstoff unter definierten Bedingungen am Wirkort freisetzen sollen. Als stationäres, therapeutisches System können u.a. Wundabdeckungen oder transdermale Pflaster verwendet werden. Diese Systeme weisen meist ein Wirkstoffdepot auf, aus dem der Wirkstoff kontinuierlich freigesetzt und dann über die Haut aufgenommen wird. Als Depotsysteme können auch Hydrogele, Liposomen, Protein-, Polysaccharid- sowie anorganische Partikel verwendet werden, welche entweder mit dem Wirkstoff beladen sind oder dieser daran gekoppelt ist. Bei allen Systemen gilt aber der Grundsatz: Je langsamer die Freisetzung erfolgt, desto konstanter ist die Wirkstoffkonzentration im Körper. Dies konnte unter anderem für das Diabetes Typ 2 Medikament BYDUREON® (Wirkstoffgruppe der Exenatide) erreicht werden.¹¹⁶ Ein Peptid aus dem Speichel der Gila-Krustenechse, das Glukagon-ähnliche Peptid 1 (*Glucagon-like peptide 1*, GLP-1), wird in Polylactid-co-Glycolid (PLGA)-Partikel verpackt und mittels Spritze in das Bauchgewebe injiziert.¹¹⁷ Dort agglomerieren die Partikel und setzen über Wochen das aktive Peptid konstant frei.

Für einige Krankheitsfälle stehen sogar noch weitaus komplexere Behandlungsformen zur Verfügung. So können bei vielen Systemen nicht nur Peptide oder Proteine verpackt werden, sondern sogar ganze Zellen (z.B. Langerhans'sche Zellen für die Diabetes-Behandlung)¹¹⁸.

Als Trägermaterialien der aktiven Verbindungen haben sich sowohl natürliche als auch synthetische Polymere als geeignet erwiesen. Je nach System können Modifikationen entsprechend des Einsatzgebietes vorgenommen werden. Auf diese Weise können die Trägermaterialien je nach Anwendungsbereich bioabbaubar implementiert werden, woraus eine Kontrolle der Struktur und Funktion resultiert.

Bei der Verwendung von Systemen, die nicht als Ganzes von Zellen aufgenommen werden und den Wirkstoff innerhalb der Zelle freisetzen, wird der Wirkstoff oft über Efflux-Pumpen aus den Zellen ausgeschleust.^{119, 120} Eine Alternative bietet hier die Verwendung von kleinen, mobilen Transportsystemen, welche von den Zellen aufgenommen werden, und bei denen die Freisetzung des Wirkstoffes innerhalb der Zelle erfolgt. Dies hat natürlich auch geringere Nebenwirkungen zur Folge, da der Wirkstoff vor Ort freigesetzt wird, und nicht der ganze Körper überschwemmt werden muss. Für derartige Systeme kommen Liposomen, Mizellen, Kapseln und Partikel zum Einsatz (Abbildung 5).

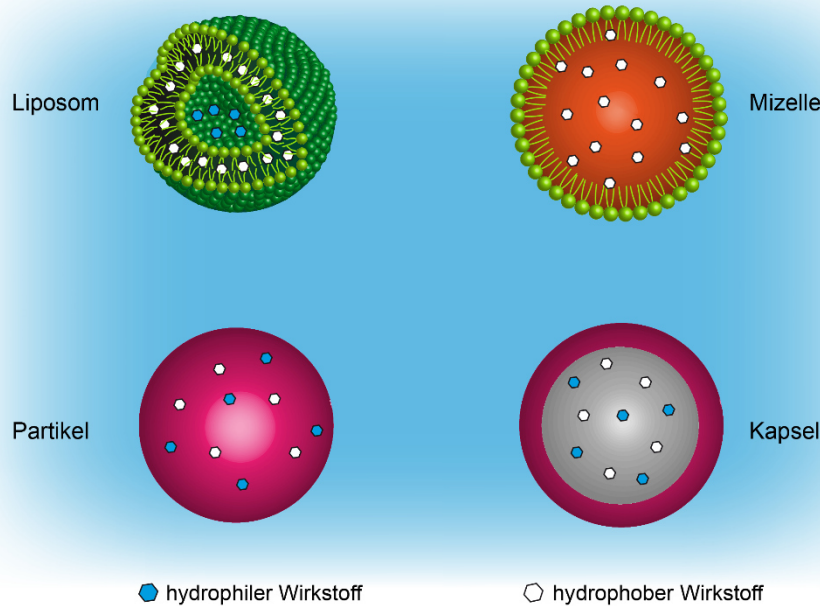


Abbildung 5: Partikuläre Wirkstofftransportsysteme im wässrigen System. In Liposomen können im inneren Bereich hydrophile und innerhalb der Lipiddoppelschicht hydrophobe Verbindungen verpackt werden, während Mizellen nur hydrophobe Wirkstoffe einschließen können. Wirkstoffe können auch von Partikeln adsorbiert oder im Inneren kapsulärer Systeme transportiert werden.

Liposomen bestehen in der Regel aus einer Phospholipiddoppelschicht und haben eine Durchschnittsgröße von 80-300 nm.^{119, 121} Sie besitzen einen amphiphilen Charakter, wobei die hydrophilen Bereiche der Lipidschichten zum Inneren des Vesikels und zur Umgebung des Vesikels (im wässrigen System) gerichtet sind. Dadurch befinden sich die hydrophoben Seitenketten im Inneren der Doppelschicht. Synthetisch können unilamellare sowie multilamellare Liposomen in der Größe von 25 nm – 100 µm hergestellt werden. Hydrophile Wirkstoffe können im Vesikelinneren, hydrophobe Wirkstoffe innerhalb der Doppelschicht und amphiphile Substanzen an der Übergangsgrenze zwischen hydrophiler Kopfgruppe und hydrophober Seitenkette verpackt werden. Somit kann mit Hilfe von Liposomen ein enormes Anwendungsspektrum in Bezug auf therapeutisch aktive Verbindungen realisiert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit von Liposomen mit biologischen Membranen sind sie biokompatibel und können mit jeder Membran fusionieren. Ist ein Liposom jedoch einmal mit einer Membran verbunden, wird der Wirkstoff sofort ins Zellinnere abgegeben. So können nur Zellen an der Oberfläche einer Gewebeschicht mit Liposomen interagieren, da ein Transport durch das Gewebe nicht möglich ist.

In wässrigen Systemen können hydrophobe Wirkstoffe nicht nur von Liposomen, sondern auch von Mizellen transportiert werden. Mizellen bestehen in biologischen Systemen aus

Molekülen mit amphiphilem Charakter wie z.B. Lipide, wobei der hydrophile Teil zur wässrigen Umgebung und der hydrophobe Teil nach innen gerichtet ist. Wie auch bei den Liposomen erfolgt die Wirkstofffreisetzung durch die Fusion der einzelnen Mizelle mit der Zellmembran. Mittlerweile existieren mizellare Systeme auf Polymer-Basis, die die Mizelle stabiler und je nach Anwendung modifizierbar machen.¹²²

Als weiteres mobiles Transportsystem werden Kapseln verwendet. Sie bestehen aus einem inneren flüssigen Kern, der von einer Hülle umgeben ist. Kapseln können u.a. durch Grenzflächenpolymerisation an zwei Lösungsmitteln oder um einen soliden Kern (Colton-Verfahren), der in die Gelatine- oder Polymerlösung getaucht und nach der Kapselbildung wieder entfernt wird, gebildet werden. Im Vergleich zur Mizelle bestehen hier die Bausteine nicht aus einer polaren hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Teil, der nach innen gerichtet ist. Die einzelnen Bausteine können dennoch einen amphiphilen Charakter aufweisen. Je nach Material kann die Kapselmembran durchlässig sein, sodass der transportierte Wirkstoff langsam nach außen diffundieren kann, oder aber undurchlässig, wodurch die Wirkstofffreisetzung erst durch die Zerstörung der Kapsel erfolgt. Es können verschiedenste Kapseltypen wie Protein- oder Polymer-Kapseln¹²³⁻¹²⁶, *multilayered* Mikrokapseln¹²⁷, Polyelektrolyt-Kapseln¹²⁸ oder anorganisch/organische Nanokomposit-Kapseln¹²⁹ hergestellt werden. So vielfältig die Kapseltypen sind, so vielfältig können auch die Wirkstoffe sein, die verkapselt werden. So wurden bereits Krebsmedikamente wie Adriamycin¹³⁰ oder Doxorubicin^{131, 132}, therapeutische Proteine/Enzyme¹³³ oder *antisense* Moleküle für die Gentherapie^{134, 135} verpackt. Durch die Verkapselung der Wirkstoffe können diese effektiv gegenüber proteolytischem Verdau oder Metabolisierung geschützt werden.¹³³

Neben den Kapsel-Systemen werden zum Wirkstofftransport auch partikuläre Systeme verwendet. Die Partikel können aus verschiedensten Materialien bestehen. Eine große Gruppe bilden anorganische Materialien wie z.B. Gold¹³⁶, Metalloxide und -sulfide^{137, 138}, Siliziumdioxid^{139, 140} und Calciumphosphat^{141, 142}. Die Größe und Form der Partikel wird durch den Herstellungsprozess bestimmt und kann an die vorgesehene Anwendung oder den verwendeten Wirkstoff angepasst werden. Anorganische Partikel sind über weite Bereiche der Temperatur- und pH-Skala stabil, können jedoch oft vom Körper nicht abgebaut werden, was zur Akkumulation innerhalb bestimmter Organe führt.¹¹⁹ Eine weitere sehr vielversprechende Materialgruppe stellen Polymere dar. Polymere sind sehr vielseitig und ihre Eigenschaften wie Hydrophobizität, Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität sind leicht an den verwendeten Wirkstoff sowie die Art der Anwendung anpassbar. Zusätzlich bietet sich ein weites chemisches und strukturelles Modifikationsspektrum, wodurch u.a. die Interaktion mit Zellen oder

Gewebe beeinflusst werden kann. Hierdurch werden eine höhere Effizienz der Partikel-Aufnahme und die gezielte Steuerung der Art der Aufnahme in Zellen oder Gewebe möglich.¹⁴³ So können spezielle Erkennungssequenzen für Oberflächenrezeptoren von Zellen oder Zell-penetrierende Peptide direkt an die Transporter gekoppelt werden und so die Aufnahmerate gesteigert werden. Die Beladung mit einem Wirkstoff kann mittels Adsorption an der Partikeloberfläche oder per Diffusion in die Partikelmatrix erfolgen. Weiterhin kann der Wirkstoff auch über eine kovalente Bindung an die Oberfläche gekoppelt werden, was dann meist erst nach der Partikelherstellung durchgeführt wird.¹⁴⁴ Die Freisetzung erfolgt anschließend, wie bei kapsulären Systemen, entweder mittels Diffusion oder durch die Degradation des Partikels am Wirkort.

Bei einem Einsatz von Partikeln als mobiles Wirkstofftransportsystem sollten diese im Zielgewebe von Zellen aufgenommen werden, um so eine Wirkstofffreisetzung ausschließlich innerhalb der Ziel-Zellen zu gewährleisten. Leider ist die zelluläre Aufnahmerate oft sehr gering, wodurch die Transport-Partikel für eine effektivere spezifische oder unspezifische Aufnahme modifiziert werden müssen.

1.4.2 Modifikation von Transportsystemen mit Zell-penetrierenden Peptiden

Soll ein Transportvesikel von Zellen aufgenommen werden, muss es in erster Linie die Barriere der Zellmembran überwinden. Für die meisten Moleküle ist dies unmöglich, allerdings existiert eine Klasse von Peptiden, die in der Lage sind, die Plasmamembran von Zellen zu durchdringen und dabei Cargos in die Zelle zu transportieren. Diese Peptide werden als Zell-penetrierende Peptide (ZPPs) bezeichnet und umfassen eine Klasse meist kationischer Peptide mit einer Größe von 5-30 Aminosäuren.¹⁴⁵⁻¹⁵¹ Das erste ZPP wurde 1988 als Teil des Proteins *transactivator of transcription factor* (Tat) des HI-Virus entdeckt, welches für die Überwindung der Zellmembran und die Aktivierung des viralen Promoters verantwortlich ist.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Heute sind viele weitere Proteine mit Zell-penetrierender Wirkung bekannt, wobei grundsätzlich für die Penetration selbst lediglich eine kurze Peptidsequenz verantwortlich ist.

Mittlerweile werden sowohl natürliche, als auch synthetische Peptide, meist basierend auf natürlichen Sequenzen, eingesetzt. Im Vergleich zu anderen Transportmethoden wie Transfektion von DNA mittels verschiedener Reagenzien (z.B. Polyethylenimin) oder viraler Vektoren kann bei der Verwendung von ZPP eine gesteigerte Zellaufnahme detektiert

werden.¹⁵⁵ ZPP lassen sich auf Grund ihrer physikochemischen Eigenschaften in drei Gruppen einteilen (Abbildung 6 und Tabelle 2).

Die erste Gruppe umfasst kationische ZPP mit einer hohen positiven Nettoladung und mit nur wenigen sauren Aminosäureresten.¹⁵⁶ Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass für eine effektive Penetration mindestens acht positive Ladungen benötigt werden.^{157, 158} Für verschiedene kationische ZPP wie das R8- oder Tat-Peptid wurden Kernlokalisierungseigenschaften beschrieben.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Die zweite Gruppe beinhaltet Peptide mit amphipathischen Eigenschaften wie z.B. MPG¹⁶² oder CADY¹⁶³. Diese Gruppe lässt sich wiederum in zwei amphipathische Untergruppen aufteilen. Die erste Gruppe (primär amphipathisch) weist polare und unpolare Blöcke in ihrer Primärsequenz auf, wohingegen bei der zweiten Gruppe (sekundär amphipathisch) die hydrophoben und hydrophilen Bereiche erst nach Ausbildung der Sekundärstruktur entstehen. Viele amphipathische ZPP beinhalten zudem einen hohen Anteil an Prolin.¹⁶⁴ Synthetische Peptide dieser Gruppe basieren meist auf der aminoterminalen Domäne des Maisproteins γ -Zein oder wurden von Poly-Prolin-Helix basierenden Peptiden abgeleitet.¹⁶⁵

Wie genau ZPP die Plasmamembran überwinden ist nicht bekannt. Der Aufnahmeweg eines ZPPs ist abhängig von den Eigenschaften des Peptids, worüber es mit verschiedensten Zelloberflächenmolekülen interagieren kann. Je nach Interaktionspartner variiert der Aufnahmeweg, aber auch eine direkte Penetration ist möglich. Generell wird davon ausgegangen, dass die erste Interaktion auf elektrostatische Wechselwirkungen der ZPP mit den negativ geladenen Proteoglykanen und Phospholipiden eingeleitet wird.¹⁶⁸⁻¹⁷² Die Art der Aufnahme in die Zelle ist stark vom gebundenen Cargo, der Konzentration des ZPPs in Lösung, des Typs der aufnehmenden Zelle sowie der Inkubationszeit und -temperatur abhängig.^{162, 173-177} Das Tat-Peptid zeigt gebunden an ein großes Cargo eine Aufnahme mittels Endozytose, gebunden an ein kleines Cargo aber eine Aufnahme mittels Penetration.¹⁷⁷ Nicht nur der Aufnahmeweg kann sich je nach ZPP unterscheiden, sondern auch die Art der Prozessierung innerhalb der Zelle. So konnte für das R8- bzw. R16-Peptid jeweils der gleiche Aufnahmemechanismus, aber eine unterschiedliche Prozessierung innerhalb der Zelle nachgewiesen werden.¹⁷⁸ Mittels ZPP können verschiedene Cargos wie DNA, RNA, Peptide, Proteine oder Transportsysteme wie Liposomen oder Nanopartikeln transportiert werden.¹⁴⁶⁻¹⁵¹ Die Kopplung des Cargos an ein ZPP kann kovalent oder nicht-kovalent erfolgen. Der Transport von ZPP/Cargo erfolgt nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* z.B. bei der Verabreichung des gekoppelten ZPP (D)R₈ an Doxorubicin bei Mäusen.¹⁵⁹ Hier akkumuliert das ZPP/Cargo Konjugat im Tumorgewebe, wodurch gezeigt werden konnte, dass ZPPs sich auch für einen gezielten Wirkstofftransport eignen. Viele bisher kaum von Zellen aufgenommene Transportsysteme oder Wirkstoffe könnten durch die Verbindung mit einem ZPP so zur Medikation eingesetzt werden.

Tabelle 2: Repräsentative Zell-penetrierende Peptide unterteilt in die drei Gruppen kationische, amphipathische und hydrophobe Peptide.

ZPP	Sequenz	Herkunft
<i>Kationisch</i>		
Tat¹⁵⁴	YGRKKRRQRRR	TAT Domäne
Poly-Arginin (R8-R16)^{157-159, 178-183}	RRR[R] ₁₋₈ RRRR	synthetisch
Penetratin^{184, 185}	RQIKIWFQNRRMKWKK	Antennapedia Homeodomäne
DPV3¹⁸⁶	RKKRRRESRKKRRRES	humane Heparin-Bindeproteine
R6H4¹⁸⁷	RRRRRRHHHH	synthetisch
KAFAK¹⁸⁸	KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA	synthetisch
NLS¹⁶¹	CGYGPKKKRKVGG	SV40 NLS Peptid
(RXR)⁴¹⁸⁹	(R-Ahx ⁸ -R) ₄	synthetisch
Protamine-1¹⁹⁰	PRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRRGRRR	DNA-Bindeproteine
<i>Amphipathisch</i>		
RGD^{155, 191}	GRGDSY	verschiedene z.B. Fibronectin
pVEC¹⁹²	LLIILRRRIRKQAAHAHSK	murines vaskuläre Endothel-Cadherinprotein
BPrP(1-28)¹⁹³	MVKSIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRP	N-Terminus des bovinen Prionproteins
SAP¹⁹⁴	(VRLPPP) ₃	N-terminale Domäne von γ -Zein
MPG^{162, 195, 196}	GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV	Glykoprotein 41
Bac7^{197, 198}	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG	Bactenecin-Familie der antimikrobiellen Peptide
hLF¹⁹⁹	KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR	antimikrobielles Peptid
CADY¹⁶³	GLWRALWRLRLSLWRLWRA	synthetisch
ARF(1-22)²⁰⁰	MVRRFLVTLRIRACGPPRVRV	p14ARF Protein
MAP²⁰¹	KLALKLALKALKAAALKLA	synthetisch
<i>hydrophob</i>		
VPTLK^{202, 203}	VPTLK	Bip
FGF²⁰⁴	PIEVCMYREP	zelluläre und virale Proteine
PFV²⁰⁵	PFVYLI	C105Y
SG3²⁰⁶	RLSGMNEVLSFRWL	randomisierte Peptid-Bibliothek
Pep-7^{195, 207}	SDLWEMMMVSLACQY	CHL8

1.4.3 Biomaterialien als Wirkstofftransportsysteme

Generell dürfen in der Biomedizin eingesetzte Materialien keine immunogene, allergene oder toxische Wirkung aufweisen. Darüber hinaus sollte eine Kontrolle über die Struktur, Morphologie und Funktion der Materialien stets gegeben sein.²⁰⁸ Gerade für mobile Systeme sollte das verwendete Material biokompatibel und bioabbaubar sein, da sonst eine Akkumulation erfolgt, die meist operativ entfernt werden muss. Bei der Bioabbaubarkeit muss darüber hinaus gewährleistet sein, dass die Abbauprodukte ebenfalls keine toxischen, allergenen oder immunogenen Reaktionen im Körper hervorrufen. Als Materialien für die Produktion von partikulären Wirkstofftransportern wurden bisher oft Metalle oder andere anorganische Verbindungen verwendet. Häufig werden Gold, Eisenverbindungen oder Siliziumdioxid als Ausgangsmaterial für Nanopartikel eingesetzt, da diese durch ihre physikalischen, chemischen, optischen, magnetischen und elektrischen Eigenschaften ein breites Anwendungsspektrum liefern.²⁰⁹⁻²¹⁴

Heutzutage finden jedoch bevorzugt Polymere ihren Einsatz. Sie können über chemische Gruppen sehr leicht modifiziert und so je nach Einsatzart, -ort oder der benötigten Eigenschaften spezifisch angepasst werden. Dadurch kann ein gerichteter Transport, eine effiziente Wirkstoffverpackung und eine Freisetzung der Wirkstoffe über Wochen bis Monaten erreicht werden.^{119, 215} Als Träger können synthetische Polymere (Polylactide, Polylactid-co-Glycolid, Polyglycoide, Polyester, etc.)²¹⁶⁻²¹⁹ wie auch natürliche Polymere (Gelatine, Alginat, Chitosan, Seidenproteine)²²⁰⁻²²⁵ eingesetzt werden. Synthetische Polymere benötigen oft organische Lösungsmittel für die Verarbeitung oder weisen harsche Produktionsbedingungen auf, was zu verringerter Biokompatibilität und toxischen Rückständen oder Abbauprodukten führen kann. Natürliche Polymere lassen sich unter milden oder sogar wässrigen Bedingungen herstellen (z.B. Seidenproteine, Polysaccharide). Aufgrund der schnellen Bioabbaubarkeit natürlicher Polymere müssen diese jedoch häufig mittels Quervernetzung stabilisiert werden. Die meisten Quervernetzungs-Reagenzien, wie z.B. Glutaraldehyd, vernetzen jedoch auch Proteine und andere Verbindungen, was wiederum zu toxischen Nebeneffekten oder ungewünschten Reaktionen mit dem eigentlichen Stoff führen und unerwünschte Wirkstoff-Derivate hervorbringen kann.^{226, 227} Viele natürlichen Polymere sind hydrophil, wodurch eine schnelle Wirkstofffreisetzung resultieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Seidenproteinen gearbeitet.

1.5 Seide

Die Klassen der Insekten (Insecta), Tausendfüßer (Myrapoda), und Spinnentiere (Arachnida), welche alle dem Stamm der Gliederfüßer (Arthropoda) zugeordnet werden, gehören zu den Erzeugern von Seide. Viele Produzenten weisen spezialisierte Drüsen auf, in welchen hochkonzentrierte wässrige Lösungen durch das Verspinnen in einen wasserunlöslichen Faden überführt werden.²²⁸ Seiden sind aus hochrepetitiven Aminosäure-Sequenzen mit einem großen Anteil an Glycin, Alanin und Serin aufgebaut. Die bemerkenswerten mechanischen Eigenschaften basieren auf der Kristallinität des Seidenfadens, welche durch verschiedene Sekundärstrukturelemente wie *coiled-coils* (α -helikale Stränge), *cross- β* , oder antiparallele β -Faltblätter hervorgerufen werden.²²⁹

Die meisten seidenproduzierenden Tiere stellen Seiden mit einem hohen Anteil an parallelen und antiparallelen β -Faltblättern her. Die Ausrichtung der β -Faltblätter erfolgt entlang der Faserachse, wodurch eine höhere Zugfestigkeit im Vergleich zu den anderen beiden Seidenarten resultiert.²²⁸ Dieser Seidentyp wird von Insekten und Spinnentieren gleichermaßen hergestellt. Seiden mit einem hohen Anteil *coiled-coil* bildender Proteine zeigen eine hohe Dehnbarkeit und werden von Insekten wie Bienen, Hornissen oder Ameisen produziert.²³⁰ Die Seiden von Wasserkäfern, Glühwürmchen, Rüsselkäfern oder Florfliegen zeigen zusätzlich zur hohen Dehnbarkeit auch eine deutliche Biegesteifigkeit.²³¹ Diese beruht auf der Anordnung der β -Faltblätter senkrecht zur Faserachse (*cross- β* -Struktur).

1.5.1 Spinnenseide

Neben der Seide des Seidenspinners *Bombyx mori*, zählt die Spinnenseide zu den bekanntesten Seidenarten. Etwa die Hälfte aller heute bekannter Spinnenarten (ca. 45000 weltweit)²³² fangen ihre Beute mittels vielseitig gestalteter Netze. So werden Trichter-, Hauben-, Wurf-, Baldachin- und Radnetze hergestellt.²³³ Weibliche Radnetzspinnen können hierbei bis zu sieben unterschiedliche Seidenarten produzieren, die sich in ihrer Zusammensetzung und somit den mechanischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Namensgebend für die einzelnen Seidenarten ist die jeweilige Drüse, in welcher sie gebildet werden.²³⁴ Fünf der sieben Seidentypen werden beim Bau des Radnetzes eingesetzt, die übrigen zum Beutefang und zum Schutz der Nachkommen (Abbildung 7).

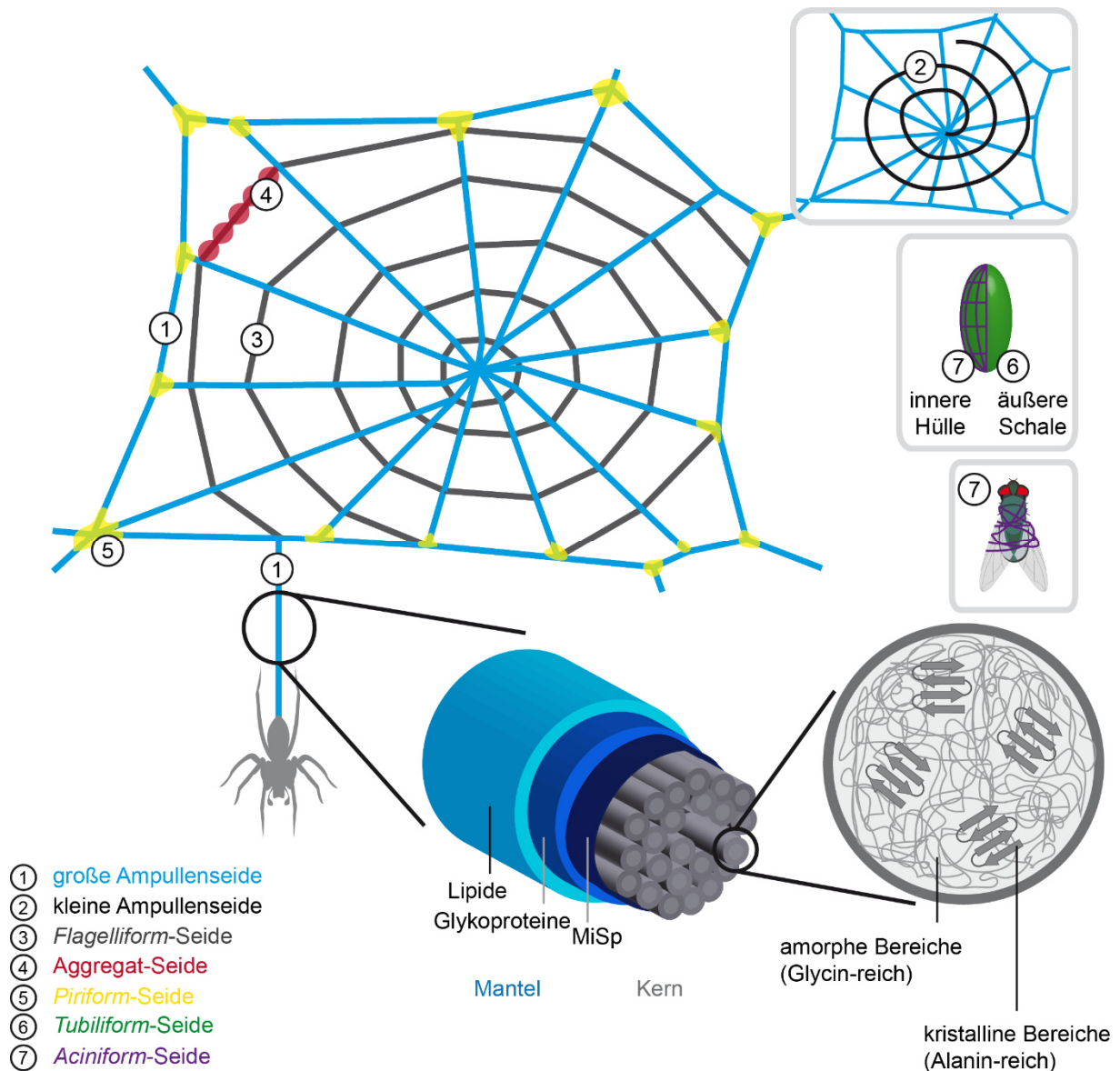


Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Seidenarten von weiblichen Radnetzspinnen sowie Aufbau der dragline-Seide. Der Rahmen, die Speichen und der Abseilfaden in Netzen der Radnetzspinnen bestehen aus Seide der großen Ampullendrüse (1). Die Fangspirale ist aus *Flagelliform*-Seide (3) aufgebaut, welche zum Beutefang mit Aggregat-Seide (4) („Klebstoff“) beschichtet ist. Während des Netzbaues setzt die Spinne eine Hilfsspirale aus Seide der kleinen Ampullendrüse (2) ein, welche anschließend teilweise wieder abgebaut wird. Zur Befestigung des Netzes an einer Oberfläche sowie der Speichen am Rahmen wird *Piriform*-Seide (5) verwendet. Der Kokon (grün) dient den Nachkommen als Schutz und ist im Inneren aus *Aciniform*- (7) und außen aus *Tubuliform*-Seide (6) aufgebaut. Auch die Beute wird mit *Aciniform*-Seide eingewickelt. Die große Ampullenseide, auch *dragline*-Seide genannt, besteht aus einer Mantel-Kern-Struktur, wobei der Mantel aus Lipiden, Glykoproteinen und Seidenproteinen der kleinen Ampullendrüse (MiSp) aufgebaut ist. Der Kern wird von semikristallinen Fibrillen gebildet, die ihrerseits aus mindestens zwei Spidroinen der großen Ampullendrüse (MaSp1/MaSp2) bestehen. Strukturell bestehen die Fibrillen aus einer amorphen Matrix in die kristalline Bereiche eingebettet sind.

Die Seide der großen Ampullendrüse (*major ampullate*), die sogenannte *dragline*-Seide, ist einer der Hauptbestandteile des Radnetzes. Sie wird für Rahmen und Speichen des Netzes eingesetzt und dient der Spinne zusätzlich als Abseil- bzw. Sicherungsfaden.²³⁵⁻²³⁷ Die Fasern bestehen im Kern aus Proteinen, die in der großen Ampullendrüse gebildet werden, und zeichnen sich durch eine hohe Zugfestigkeit aus.

Die Fangspirale des Radnetzes wird aus *Flagelliform*-Seide gebildet und weist eine Dehnbarkeit von bis zu 270 % auf. Diese Dehnbarkeit ist nötig um die kinetische Energie beim Aufprall der Beute abzufangen.²³⁸⁻²⁴⁰ Die Fangspirale wird zusätzlich mit Aggregat-Seide („Klebstoff“) beschichtet, um gefangene Beute an der Flucht zu hindern. Dieser Seidentyp besteht aus einem Gemisch kleiner hygroskopischer Peptide und klebriger Glykoproteine.²⁴¹ Während des Netzbaus kommt ein weiterer Seidentyp zum Einsatz, um die Konstruktion zu stabilisieren. Für diese Hilfsspirale wird die Seide der kleinen Ampullendrüse (*minor ampullate*) verwendet. Sie weist eine ähnliche Zusammensetzung wie die Seide der großen Ampullendrüse auf.^{233, 241-243} Über die *Piriform*-Seide wird die *dragline*-Seide, aber auch die Seide der kleinen Ampullendrüse und *Flagelliform*-Seide untereinander verklebt und an Oberflächen befestigt.^{244, 245} Eine gefangene Beute wird in *Aciniform*-Seide eingewickelt. *Aciniform*-Seide wird auch für die innere Kokonhülle verwendet, welcher als Schutz für den Nachwuchs dient. Die äußere Kokonhülle besteht aus *Tubiliform*-Seide, und dient als Barriere gegen Prädatoren und Parasiten.²⁴⁶⁻²⁴⁸

Die *dragline*-Seide zeichnet sich durch eine hohe Dehnbarkeit und gleichzeitig hohe Zugfestigkeit aus, was zu einer außerordentlichen, von keinem anderen Material erreichten Zähigkeit führt.^{238, 245} Die Basis dieser mechanischen Eigenschaften ist zum einen die molekulare Struktur und zum anderen der hierarchische Aufbau des Fadens (Abbildung 7).^{229, 249} Der Faden zeigt eine Mantel-Kern-Struktur, wobei der Mantel aus Lipiden, Glykoproteinen und Seide der kleinen Ampullendrüse (MiSp) gebildet wird.²⁵⁰ Der Kern besteht aus entlang der Faser-Achse ausgerichteten Bündeln an Nano- und Mikrofibrillen,²⁵¹ die eine amorphe Matrix aufweisen. Diese Matrix ist für die hohe Dehnbarkeit der *dragline*-Seide verantwortlich, da sie aus β -Schleifen, β -Spiralen und 3_1 -Helices sowie ungeordneten β -Faltblättern besteht.²⁵² In die amorphe Matrix sind streng geordnete kristalline Bereiche eingebettet.^{253, 254} Die Proteine des Kerns werden in der großen Ampullendrüse gebildet und in zwei Klassen der Spidroine MaSp1 und MaSp2 (*major ampullate spidroin*) eingeteilt. Sie bilden kristalline Bereiche, die aus antiparallelen β -Faltblättern bestehen, mit einer Größe von ca. 2 x 5 x 7 nm und als multifunktionaler Quervernetzer wirken, der für die hohe Zugfestigkeit der *dragline*-Seide verantwortlich ist.^{229, 253, 255-258}

Die beiden MaSp-Proteine weisen Ähnlichkeiten in Aufbau und Zusammensetzung sowie ein hohes Molekulargewicht von 200-350 kDa auf. Sie besitzen eine repetitive Kernsequenz, welche von zwei nicht repetitiven terminalen Domänen (NR) flankiert wird. Die Kernsequenz kann bis zu 50 % aus Glycin, Alanin und Serin bestehen und bis zu 90 % des Gesamtproteins ausmachen.²⁵⁹⁻²⁶³ Die repetitiven Bereiche können sich innerhalb der Kernregion bis 100fach wiederholen und bestehen aus ca. 20-40 Aminosäuren.^{234, 264} Diese Module setzen sich wiederum aus Aminosäure-Blöcken wie Poly-Alanin (A_n ; $n = 4-12$), $(GA)_{4-6}$, GGX ($X = Y, L, Q$) oder GPGXX ($X = Q, G, Y$) zusammen.²⁶⁵ Je nach Modul werden verschiedene Sekundärstrukturen ausgebildet. So bilden die Alanin-reichen Blöcke antiparallele β -Faltblätter, GPGXX β -Schleifen und β -Spiralen, und GGX vermutlich 3_1 -Helices aus.^{240, 266}

Die Kernregionen der MaSp-Proteine sind im Wesentlichen für die molekularen Eigenschaften der Proteine verantwortlich, welche auf den ausgebildeten Sekundärstrukturen beruhen. Die hochkonservierten terminalen Domänen bestehen aus 100-150 Aminosäuren und spielen eine wichtige Rolle bei der Speicherung der stark konzentrierten, wässrigen Spinnlösung sowie bei der Assemblierung des Fadens.^{261, 267-269} Beide Termini sind nicht repetitive, globuläre Domänen, die aus fünf α -Helices bestehen und in der Lage sind Dimere zu bilden.^{267, 268, 270} Die beiden Spidroine unterscheiden sich lediglich in ihrem Prolin-Gehalt und der Hydrophobizität. MaSp2 Proteine wie z.B. die Spidroine der europäischen Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus* Fibroin (ADF) 3 und 4) weisen einen hohen Prolin-Gehalt von 16 % auf, wohingegen der Prolin-Gehalt von MaSp1-Proteinen niedriger ist (~3 %).^{234, 271} MaSp1 und ADF3 besitzen viele hydrophile, und MaSp2 und ADF4 mehr hydrophobe Aminosäuren.^{233, 272}

1.5.2 Rekombinante Herstellung von Spinnenseide

Auf Grund der herausragenden mechanischen Eigenschaften aber auch wegen der Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit, ist Spinnenseide in den Fokus vieler wissenschaftlicher Bereiche gerückt. Unglücklicherweise können Spinnen nicht wie der Seidenspinner *Bombyx mori* auf großen Farmen gehalten werden, da sie ein ausgeprägtes territoriales und kannibalistisches Verhalten zeigen.²⁷³ Auch ist die Seidenqualität stark abhängig von Umwelteinflüssen wie z.B. Angebot oder Variabilität der Beute. Diese Qualitätsschwankungen sind bei einer industriellen oder medizinischen Nutzung der Seide ein enormer Nachteil.^{274, 275} Die Gewinnung natürlicher Spinnenseide z.B. durch Melken der Spinnen ist darüber hinaus sehr zeitaufwendig und nur in geringem Maße durchführbar. Ein vielversprechender

Lösungsansatz zur Produktion von Spinnenseide gleichbleibender Qualität ist die biotechnologische Herstellung.

Die biotechnologische Seidenproduktion kann auf zwei unterschiedlichen Routen erfolgen. Bei der ersten Route werden natürliche Spinnenseidengene in unterschiedliche Wirtsorganismen eingebracht und dort exprimiert.²⁴⁵ Da Spinnen jedoch eine andere Codon-Verwendung als prokaryotische Wirtsorganismen aufweisen, kommt es häufig zu geringen Protein-Ausbeuten. Weiterhin werden hierbei oft polydisperse Proteine produziert, da die hoch repetitiven Sequenzen durch homologe Rekombination verändert werden.^{259, 276, 277} Unter Verwendung eukaryotischer Systeme treten hingegen oft Probleme bei der Reinigung der Proteine (z.B. Bildung von *inclusion bodies*) auf, was ebenfalls sehr geringe Ausbeuten zur Folge hat.^{277, 278} Die zweite Route ist die rekombinante Herstellung von Proteinen, die von den natürlichen Spinnenseidenproteinen abgeleitet sind. Auf Basis der natürlichen Sequenz der Proteine wird zunächst eine Konsensus-Sequenz erstellt. Dabei wird zum einen die Codon-Verwendung und zum anderen das Molekulargewicht des Proteins auf den verwendeten Wirtsorganismus angepasst.²⁷⁹ Die so entstandenen Proteine weisen dann die wichtigen Kennzeichen der Vorbilder wie intrinsisch entfaltete lösliche Struktur und Selbstassemblierungsverhalten auf.^{233, 280}

Die Versionen von eADF4 (*engineered* ADF4), welche dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden mittels der zweiten beschriebenen Route konstruiert. Die Konsensus-Sequenz, abgeleitet von ADF4 der europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus*, wurde unter Berücksichtigung der Codon-Verwendung von *Escherichia coli* in eine Nukleotid-Sequenz übersetzt. Diese Sequenz, in diesem Fall C-Modul genannt, kann beliebig oft mittels einer nahtlosen Klonierungsstrategie aneinander gereiht werden, wodurch Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht entstehen.^{272, 281} Durch Fermentation können die so konstruierten Proteine biotechnologisch hergestellt werden. Das hier verwendete artifizielle ADF4 Protein beinhaltet 16-Wiederholungen des C-Moduls (eADF4(C16)) und basiert somit auf der repetitiven Kernregion des natürlichen Spidroins aus der *dragline*-Seide von *Araneus diadematus* (Abbildung 8). Für spezifische Anwendungen können ebenfalls über eine nahtlose Klonierungsstrategie weitere Peptid-Sequenzen an eADF4(C16) angefügt werden.^{282, 283} Da eADF4(C16) pro Modul einen Glutaminsäure-Rest enthält und somit unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist, wurde diese Aminosäure durch einen Lysin-Rest ersetzt, wodurch ein positiv geladenes Gegenstück zu eADF4(C16), eADF4(κ 16), mit nahezu gleichen Eigenschaften entsteht.²⁸⁴

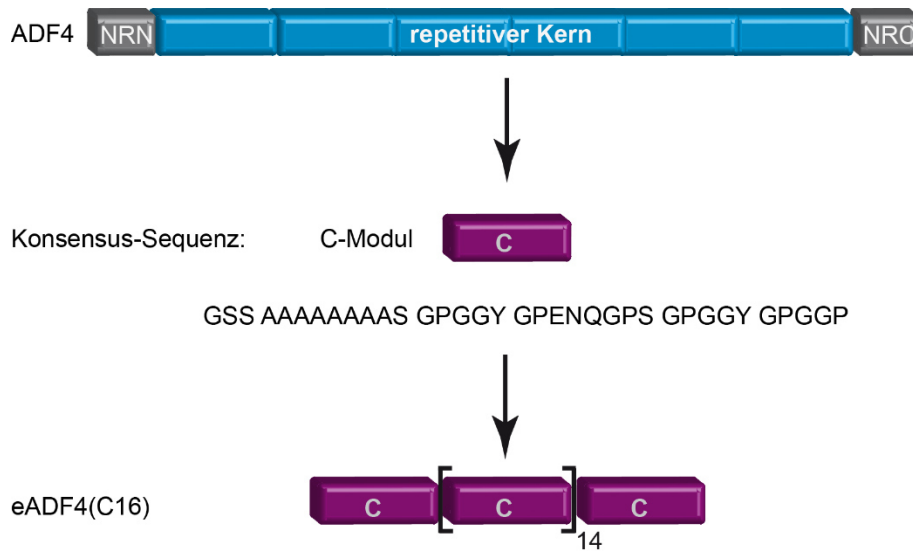


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16). Abgeleitet von der repetitiven Kernregion des Spidroins ADF4 wurde eine Konsensus-Sequenz (C-Modul) entwickelt. Durch 16-maliges Aneinanderreihen wurde das artifizielle Spinnenseidenprotein eADF4(C16) generiert. NRN: nicht-repetitive aminoterminal Domäne; NRC: nicht-repetitive carboxyterminale Domäne.

1.5.2.1 Herstellung verschiedener Morphologien aus Spinnenseidenproteinen und ihre Verwendungen als Biomaterialien

eADF4(C16) kann in verschiedene Morphologien wie Fibrillen, Vliese, Filme, Hydrogele, Kapseln oder Partikel prozessiert werden (Abbildung 9). Die Steuerung der Assemblierung in die verschiedenen Morphologien kann durch die Änderung der Umgebungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Salz-Gehalt oder Scherkräfte erfolgen. Dabei ändert sich die Struktur von ungeordnet (Proteinlösung) zu geordnet (assemblierte Morphologien).²⁸⁵

Auch die Morphologie des Spinnenseidenfadens kann mittels technischer Spinnverfahren wie Elektrosinnen oder Nassspinnen erzeugt werden. Unter Verwendung rekombinant hergestellter ADF3 Derivate (eADF3(AQ)NR3 oder N1L-eADF3(AQ)NR3) konnten bisher Fäden produziert werden, die eine vergleichbare Zähigkeit zur natürlichen Seidenfaser aufwiesen und unter anderem als chirurgisches Nahtmaterial zum Einsatz kommen können.²⁸⁶ Durch Elektrosinnen kann hingegen die Herstellung von Vliesen erfolgen. Hier wird eine konzentrierte Seidenlösung durch eine Spritze extrudiert. Durch die Anlegung einer Spannung von 5-20 kV bildet sich an der Spitze der Spritze ein kegelförmiger Tropfen, der *taylor conus*. Aus diesem Tropfen löst sich ein dünner Strahl, der zur Gegenelektrode hin beschleunigt wird. Während des Prozesses verdampft das Lösungsmittel und die entstandenen Fasern können als Vlies auf einem Trägermaterial gesammelt werden.²⁸⁷⁻²⁸⁹ Der Einsatz von Vliesen kann im

medizinischen Bereich z.B. als Wundabdeckung oder im technischen Bereich z.B. als Filter erfolgen.

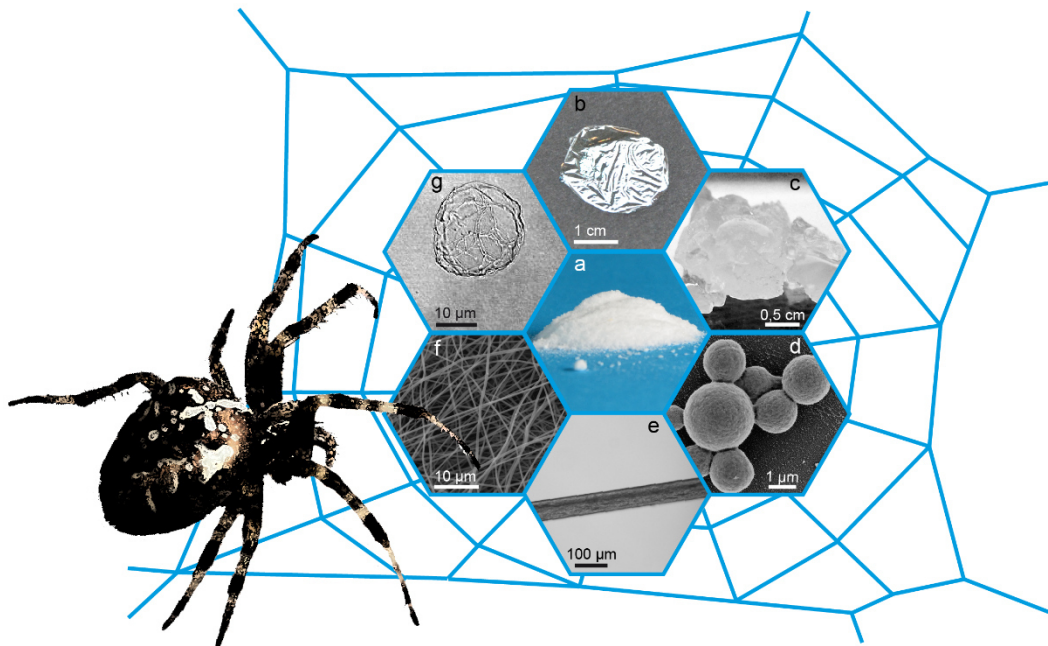


Abbildung 9: Verschiedene Morphologien von eADF4(C16). a Proteinpulver; b Film; c Hydrogel; d Partikel; e Faser; f Vlies; g Kapsel.

Spinnenseidenfilme können ebenfalls über verschiedene Verfahren wie Sprühbeschichtung (*spray coating*), Rotationsbeschichtung (*spin coating*), Tauchbeschichtung (*dip coating*) oder Rakeln hergestellt werden.²⁹⁰⁻²⁹² Das am häufigsten angewendete Verfahren ist jedoch das Gießen (*drop casting*), bei welchem die Seidenlösung zunächst auf ein Substrat gegossen wird. Ist das Lösungsmittel anschließend verdampft erfolgt eine Nachbehandlung z.B. mit Ethanol um den kristallinen Anteil (β -Faltblatt-Anteil) im Seidenfilm zu erhöhen und den Film somit in wässriger Lösung unlöslich zu machen.²⁹¹ Derartige nachbehandelte Filme können unter anderem als Implantatbeschichtung oder als Wundabdeckung eingesetzt werden.^{222, 282, 293-297}

Nach der Herstellung einer Emulsion aus wässriger Proteinlösung und Öl-Phase, assembliert eADF4(C16) an der Grenzfläche zwischen beiden Phasen.^{124, 298} Durch die anschließende Induktion von β -Faltblättern mittels Ethanol werden stabile, wasserunlösliche Kapseln erzeugt, die als Verpackung von aktiven Substanzen, wie Enzymen oder Wirkstoffen, dienen und das Verpackte schützen können.¹³³

Durch die Änderung der physikochemischen Umgebungsbedingungen vor allem durch den Austausch von Ionen (Na^+ , Cl^- durch PO_4^{3-}), Absenkung des pH-Wertes und Einwirken von Scherkräften in der Proteinlösung erfolgt eine Phasenseparation. Dadurch wird ein Seidenfaden

mit hoch geordneter Struktur gebildet.²⁹⁹ Dies kann auf eADF4(C16)-Lösungen übertragen werden und zusammen mit den amphiphilen Eigenschaften von eADF4(C16) zur Herstellung weiterer Morphologien genutzt werden. Durch Zugabe von kosmotropen Salzen zur wässrigen Lösung, in welchem das Protein intrinsisch ungefaltet vorliegt, bilden sich Nanofibrillen, sofern der Salzgehalt von 300 mM nicht überschritten wird.³⁰⁰ Durch die Salzzugabe werden die negativ geladenen Glutamat-Reste abgeschirmt, was zur Reduzierung der Coulombschen Abstoßung führt. Dadurch erfolgt eine höhere Interaktion der Proteine untereinander, und Oligomere können sich ausbilden. Ist die kritische Größe eines Nukleationskeimes erreicht, wachsen durch Anlagerung weiterer Monomere Fibrillen.^{126, 300-302} Durch die physikalische Quervernetzung von Fibrillen können Hydrogele gebildet werden.^{300, 303, 304} Die Eigenschaften, wie z.B. Porengröße, können je nach Anwendungsbereich (Wundauflage, Bereich der Wirkstofffreisetzung als Depotsystem) eingestellt werden. Durch die scherverdünnende Eigenschaft des eADF4(C16) Hydrogels, kann dieses auch als „Biotinte“ verwendet werden, womit dreidimensionale, definierte Strukturen für den Bereich des *tissue engineering* produziert werden können.³⁰⁵

1.5.2.2 Spinnenseidenproteinpartikel

Eine der am besten untersuchtesten Morphologie des rekombinanten Seidenproteins eADF4(C16) stellen Partikel dar. Die Bildung erfolgt durch Zugabe von kosmotropen Salzen (z.B. Kaliumphosphat) in hohen Konzentrationen (>400 mM) zur wässrigen Proteinlösung, in welcher das Protein intrinsisch ungefaltet vorliegt (Abbildung 10 und 11). Durch die Zugabe des Salzes wird dem Protein die Hydrathülle entzogen, wodurch stärkere hydrophobe Wechselwirkungen auftreten. Dies führt zu einer Phasenseparation in eine Protein- und eine lösungsmittelreiche Phase. In der proteinreichen Phase erhöht sich die Konzentration des Proteins bis zum Erreichen einer kritischen Konzentration, ab welcher sich Nukleationskeime bilden. Die Keime induzieren eine Strukturänderung der Proteine in ihrer Umgebung, wodurch β -Faltblatt reiche und dadurch stabile Partikel entstehen.¹²⁶ Die Größe der entstehenden Partikel kann zum einen durch die Proteinkonzentration und zum anderen durch die Mischgeschwindigkeit von Protein- und Salzlösung während des Bildungsprozesses beeinflusst werden.³⁰⁶ Fällt in der proteinreichen Phase die Proteinkonzentration unterhalb des Lösungsgleichgewichtes, so lagern sich keine weiteren Monomere an und das Partikelwachstum wird gestoppt.¹²⁶ Somit werden die Partikel umso größer, je höher die Proteinkonzentration in der Lösung ist. Eine Erhöhung der Mischgeschwindigkeit resultiert in kleineren Partikeln. Im Gegenzug lassen sich durch ein langsames Mischen von Salz- und

Proteinlösung größere Partikel erzeugen. Durch die Variation von Mischgeschwindigkeit und Proteinkonzentration können Partikel zwischen 200 nm und 3 µm erzeugt werden.

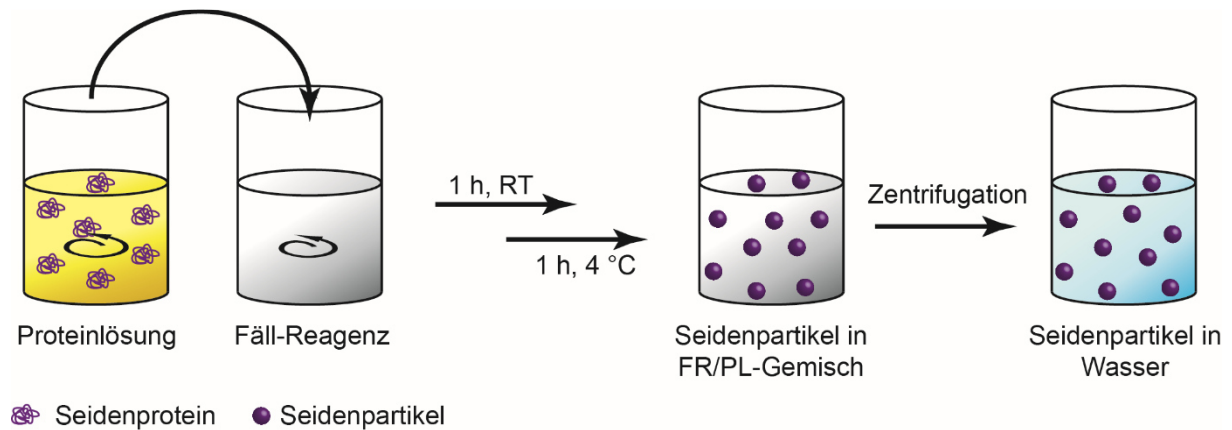


Abbildung 10: Herstellung von Partikeln aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16). Nach der Inkubation des Gemisches aus Fäll-Reagenz (FR) und Proteinlösung (PL) bei Raumtemperatur und 4 °C für je eine Stunde können die entstandenen Partikel in Wasser oder Puffer überführt werden.

eADF4(C16)-Partikel zeigen einen dreilagigen Aufbau.³⁰⁷ Der äußerste Bereich, welcher die Partikel umgibt, wird bestimmt durch elektrostatische Wechselwirkungen der Partikeloberfläche mit der umgebenden Lösung. Zum Partikelinneren hin folgt ein zweiter Bereich, der einen bürstenartigen Aufbau zeigt und sterische Interaktionen mit seiner Umgebung und anderen Partikeln eingehen kann. Der Kern der Partikel ist elastisch und kann mechanisch deformiert werden. Die Oberfläche von Spinnenseidenproteinpartikeln weist eine Rauigkeit von 17 nm auf.³⁰⁷ Des Weiteren zeigen eADF4(C16)-Partikel ein reversibles Quellverhalten von ca. 30 %, welches mittels Quervernetzung der Proteine im Partikel gesteuert werden kann.³⁰⁸ Diese Eigenschaft spielt im Bereich der Medizin oder Pharmazie eine große Rolle, da die Lagerung und Analyse der Partikel meist im dehydratisierten, die Verabreichung jedoch im hydratisierten Zustand durchgeführt wird.

1.5.2.3 Spinnenseidenproteinpartikel als Wirkstofftransportsystem

Die einfache Herstellung der Spinnenseidenproteinpartikel macht diese attraktiv für die Nutzung im Bereich des gezielten Wirkstofftransports. Nieder-molekulare Substanzen oder kleine Proteine wie Lysozym können darin verpackt werden.³⁰⁹⁻³¹¹ Dabei spielt es keine Rolle, ob die zu verpackende Substanz wasserlöslich oder wasserunlöslich ist.³¹² Die Beladung der Seidenpartikel kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen (Abbildung 11).³¹¹ Bei der ersten Variante, die jedoch ausschließlich bei wasserlöslichen Wirkstoffen angewendet werden kann,

werden die Partikel nach ihrer Herstellung über Diffusionsprozesse mit einem Wirkstoff beladen. Dabei dringt der Wirkstoff meist nicht bis ins Partikelinnere vor. Bei der zweiten Route wird der Wirkstoff mit der eADF4(C16)-Lösung gemischt und die beladenen Partikel mittels Co-Präzipitation hergestellt.

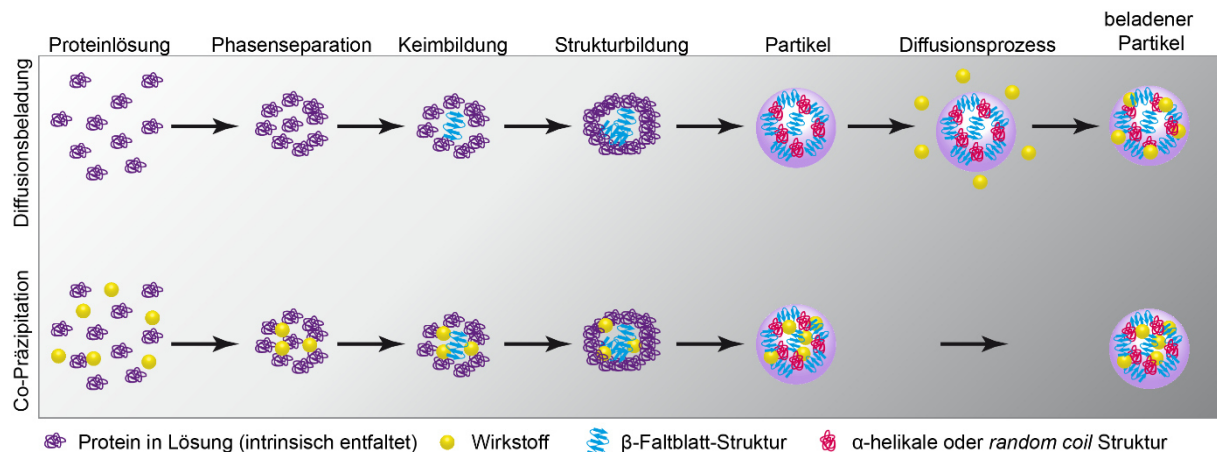


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Partikelherstellung über Diffusionsbeladung und Co-Präzipitation. Die Beladung der Partikel kann nach der Partikelherstellung über Diffusionsprozesse oder über die Co-Präzipitation des Wirkstoffes erfolgen.

Die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Partikel erfolgt unabhängig von der Beladungsart stets über Diffusionsprozesse. Auch die Geschwindigkeit der Freisetzung ist in beiden Fälle dieselbe.³¹¹ Unter Verwendung von eADF4(C16) können auf Grund der negativen Ladung des Proteins positiv oder neutral geladene Wirkstoffe verpackt werden. Für die Verpackung von negativ geladenen Wirkstoffen muss das positiv geladene Spinnenseidenprotein eADF4(κ 16) verwendet werden. Die Beladung von eADF4(κ 16)-Partikeln kann ebenfalls über beide Beladungsrouten durchgeführt werden. Neben nieder-molekularen Wirkstoffen kann hier auch DNA verpackt werden, was diese Partikel zum Einsatz als Gentransporter befähigt.²⁸⁴ Die Freisetzung der DNA erfolgt ebenfalls durch Diffusion, läuft aber im Vergleich zu Partikeln aus eADF4(C16) langsamer ab, da durch das Phosphatrückgrat der DNA eine multivalente Anbindung der DNA an den positiv geladenen Partikeln erfolgt.

2. Zielsetzung

Partikel hergestellt aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) konnten bereits erfolgreich mit verschiedenen nieder-molekularen Substanzen und kleinen Proteinen beladen und so als Wirkstofftransportsystem etabliert werden. Die bislang stets aus wässrigen Lösungen hergestellten Partikel zeigen eine Durchschnittsgröße über 250 nm mit relativ inhomogener Größenverteilung.³⁰⁶ Da zu große Partikel eher schlecht von Zellen aufgenommen werden, war ein Ziel dieser Arbeit die Durchschnittsgröße zu verringern und eine homogenere Größenverteilung durch Modifikation des Herstellungsprozesses zu erreichen.

Neben des großen Durchmessers bislang produzierbarer Partikel verhindert unter anderem ein Fehlen von Zellinteraktionsmotiven und die negative Nettoladung vieler Seidenproteine eine effektive Partikelaufnahme in Säugerzellen.²⁸³ Die erste Interaktion einer Substanz oder eines Wirkstoffpartikels mit einer Zelle erfolgt in der Regel über elektrostatische Wechselwirkungen. Da Zellen eine negativ geladene Zellmembran aufweisen, und so positiv geladene Partikel bessere Interaktionen mit der Membran eingehen können als negativ geladene, werden in der vorliegenden Arbeit neben Partikeln aus eADF4(C16) auch Partikel aus eADF4(κ 16) und Partikel aus einem Gemisch beider Proteine eingesetzt.

Als weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Aufnahmeeffizienz von eADF4(C16)-Partikeln und gegebenenfalls zur Erzeugung einer spezifischen Aufnahme, werden Zell-penetrierende Peptide wie das Tat-Peptid, Poly-Arginin oder das RGD-Peptid genetisch an eADF4(C16) angefügt. Bei der Interaktion der Partikel mit Zellen spielen in erster Linie die physikochemischen Eigenschaften der Partikel eine Rolle. Deswegen werden hier alle produzierten Seidenpartikel bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften analysiert, um Rückschlüsse auf den Einfluss dieser Eigenschaften auf die Aufnahme in Zellen zu erhalten.

Als Basis für einen zukünftigen Einsatz der Seidenproteinpartikel als Wirkstofftransporter, der von Zellen aufgenommen werden und den geladenen Wirkstoff innerhalb der Zelle freisetzen soll, wird die Aufnahme der verschiedenen Partikel qualitativ und quantitativ untersucht. Hier steht die Klärung der Frage im Vordergrund, ob mit den oben erwähnten Modifikationen und Ladungsänderungen eine Steigerung der Aufnahmerate in Bezug auf eADF4(C16)-Partikel erreicht werden kann. Da dem Aufnahmeweg jedoch je nach Interaktionsart der Partikel mit der Zellmembran unterschiedliche, zur Aufnahme führende Faktoren zu Grunde liegen, wird in der vorliegenden Arbeit der zelluläre

Aufnahmemechanismus der einzelnen Partikel-Varianten unter Verwendung von Endozytose-Inhibitoren identifiziert.

Durch eine Beladung der Seidenproteinpartikel mit einem Wirkstoff, kann sich dieser Wirkstoff auch auf der Oberfläche der Partikel anlagern, woraus oft eine Änderung der Oberflächeneigenschaften resultiert. Für einen Einsatz der Partikel als Wirkstofftransporter ist es wichtig zu ergründen, ob und in welcher Weise eine Beladung eine Änderung der Oberflächeneigenschaften zur Folge hat. Aus diesem Grund werden beladene Seidenpartikel ebenfalls in Bezug auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht. Anschließend wird geprüft, ob eine durch Beladung der Partikel mit einem Wirkstoff ausgelöste Änderung der Oberflächeneigenschaften einen Einfluss auf deren Aufnahmerate in Zellen hat und ob sich der zu Grunde liegende Aufnahmemechanismus ändert.

3. Synopsis

Die vorliegende Arbeit umfasst drei Publikationen, die in Kapitel 7 aufgeführt sind. Frühere Arbeiten zum Thema Spinnenseidenproteinpartikel als Wirkstofftransportsysteme beschäftigten sich mit der Analyse der Beladung von eADF4(C16) mit verschiedenen Wirkstoffen und der Freisetzung der aktiven Verbindungen aus den Partikeln in Abhängigkeit von pH, Salzkonzentration, Beladungsroute und Quervernetzung der Partikel.^{309, 311} Für eine Anwendung der Partikel als Wirkstofftransportsystem ist es jedoch erforderlich, die Aufnahme der Partikel aus eADF4(C16) durch Zellen mit und ohne Beladung zu analysieren sowie den Aufnahmemechanismus zu identifizieren. Deswegen wurde hier die Interaktion von Spinnenseidenproteinpartikel mit zellulären Systemen in Gegenwart oder Abwesenheit einer Wirkstoffbeladung untersucht (Abbildung 12). Dabei steht stets die Analyse der Aufnahmerate sowie der zugrunde liegende Aufnahmemechanismus im Vordergrund. Bei der Interaktion von Zellen mit Partikeln, die aufgenommen werden sollen, spielen unspezifische wie auch spezifische Interaktionen eine wichtige Rolle. So kann ein Partikel über elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkung mit der Plasmamembran der Zelle in Kontakt treten. Ist ein Partikel hydrophob oder positiv geladen ist die Wahrscheinlichkeit, dass dieser mit der vorwiegend negativ geladenen Plasmamembran interagieren kann und letztendlich ins Zellinnere aufgenommen wird deutlich größer, als bei hydrophilen und/oder negativ geladenen Partikeln. Zusätzlich konnten die Partikel mit funktionellen Gruppen modifiziert werden, die spezifisch an Oberflächenrezeptoren binden und so eine Aufnahme induzieren.

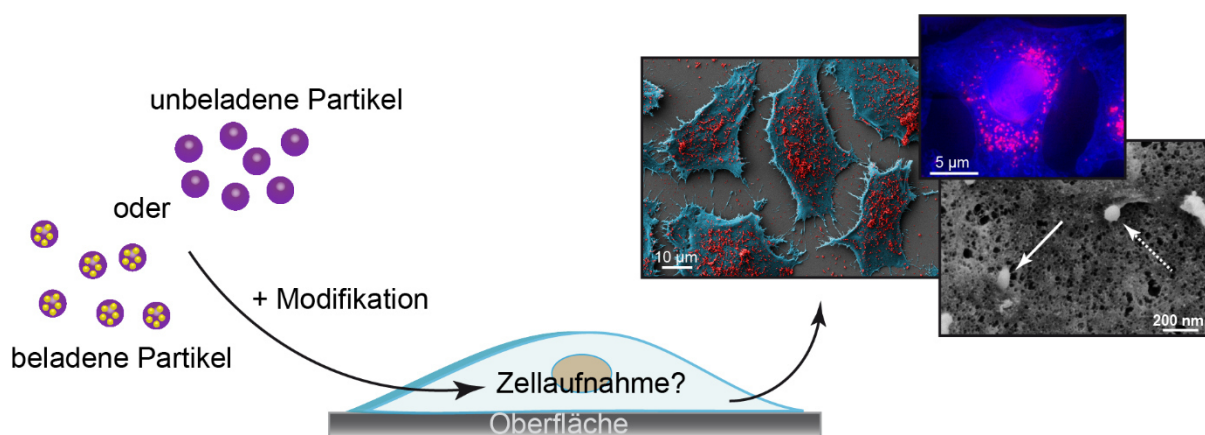


Abbildung 12: Interaktion von Zellen mit Spinnenseidenproteinpartikeln. Schematische Darstellung der Interaktion sowie der Aufnahme von unbeladenen und beladenen Spinnenseidenproteinpartikeln. Modifiziert nach Elsner et al., *Biomaterials Science*, 2015, 3, 543-551 mit freundlicher Genehmigung des Verlages *The Royal Society of Chemistry*.

Da das Protein eADF4(C16) keinerlei Zellinteraktionsmotive aufweist und darüber hinaus negativ geladen ist, sollte die Interaktion mit Zellen und somit die Aufnahmeeffizienz von entsprechenden Partikeln durch die Veränderung der Ladung sowie durch das Einbringen von Zell-penetrierenden Peptiden erhöht werden (Abbildung 13). Dazu wurden klassische ZPP (Tat-peptid, Poly-Arginin-Peptid) sowie die minimale Erkennungs-Sequenz für Integrine (RGD-Peptid) verwendet. Nach genetischer Modifikation der eADF4(C16)-Sequenz mit den Peptid-kodierenden Sequenzen, konnte eine deutlich gesteigerte Aufnahmeeffizienz der resultierenden Partikel durch HeLa-Zellen gezeigt werden (Teilarbeit I). Auch durch die Änderung der Ladung von eADF4(C16), durch den Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutaminsäure durch Lysin und dem daraus resultierenden Protein eADF4(κ 16) konnte die Aufnahme enorm gesteigert werden. Da diese modifizierten Partikel ein hohes Potential für die Verwendung als Wirkstofftransporter aufweisen, eine Beladung mit Wirkstoffen jedoch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel verändern kann, wurde weiterhin der Einfluss der Beladung auf die Aufnahme analysiert (Teilarbeit II). Hierbei konnte eine deutliche Steigerung der Partikelaufnahme mit dem positiv geladenen Polyethylenimin für eADF4(C16) und eADF4(C16)RGD sowie mit negativ geladener DNA für eADF4(κ 16) nachgewiesen werden. Die eADF4(κ 16)-Partikel mussten jedoch nach der Beladung mit einer erneuten Proteinschicht beschichtet werden. Dabei zeigte sich, dass die Änderung der Ladung der Partikel oder die Beladung mit positiv und negativ geladenen Wirkstoffen einen Einfluss auf die Interaktion der Partikel mit Zellen und somit auf die Aufnahme der Partikel durch die Zellen hatte.

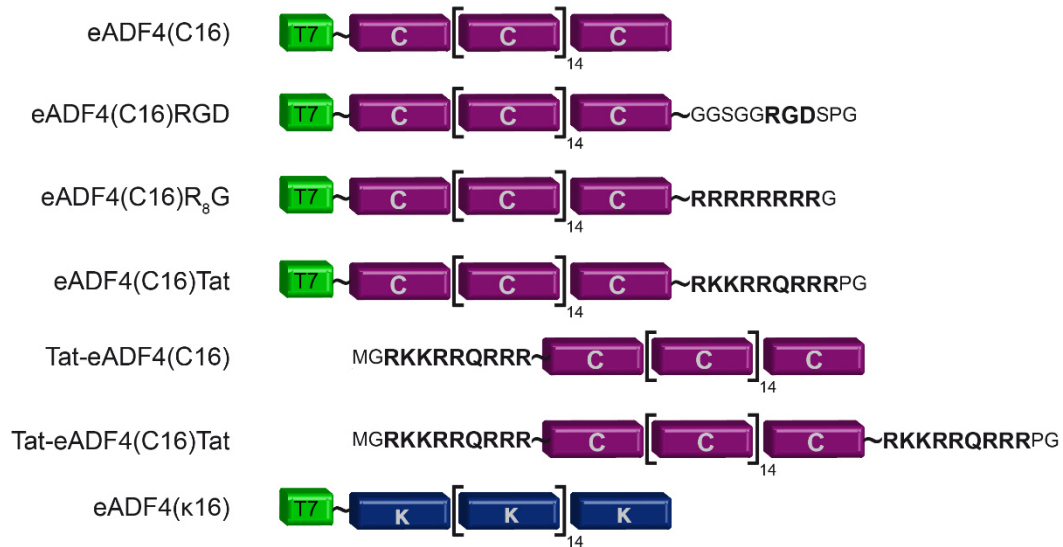


Abbildung 13: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Varianten von eADF4(C16). Bis auf Tat-eADF4(C16) und Tat-eADF4(C16)-Tat weisen alle Proteine an ihrem Aminoterminus einen T7-tag für einen spezifischen Nachweis auf. Alle Peptide wurden mittels nahtloser Klonierungsstrategie an eADF4(C16) angebracht. Die Aminosäure Glutaminsäure (1 pro C-Modul) wurde durch die Aminosäure Lysin ersetzt, wodurch das κ -Modul entsteht.²⁸⁴ Durch Multimerisierung wurde, ebenfalls mittels nahtloser Klonierungsstrategie, eADF4(κ 16) erzeugt. Modifiziert nach Elsner et al., *Biomaterials Science*, 2015, 3, 543-551 mit freundlicher Genehmigung des Verlages *The Royal Society of Chemistry*.

Die dritte Arbeit stellt einen Übersichtsartikel dar, in dem der aktuelle Stand der Forschung zu Oberflächenmodifikationen aus Seidenproteinen in Bezug auf technische (z.B. Biosensoren) und medizinische Anwendung (z.B. Implantatbeschichtungen, Wirkstofftransport) näher beleuchtet wird.

In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen der in Kapitel 7 angehängten Publikationen kurz dargestellt und diskutiert. Weiterführende Ergebnisse und detaillierte experimentelle Informationen sind den Publikationen zu entnehmen.

3.1 Zelluläre Aufnahme von Spinnenseidenproteinpartikeln

Die Aufnahme von Seidenpartikeln durch Säugerzellen ist niedrig, wahrscheinlich bedingt durch die relativ großen Partikel-Durchmesser, fehlender Bindungsliganden sowie negativer Netto- (eADF4(C16): $pI \ 3,48$)²⁸³ bzw. Oberflächenladung (eADF4(C16) Partikel: $-26,7 \pm 2,6 \text{ mV}$)²⁸³ der Seidenpartikel.^{145, 313, 314} In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Strategien entwickelt, um die Interaktion der Spinnenseidenproteinpartikel mit Zielzellen und somit die Effizienz der Partikelaufnahme zu verbessern. Zunächst erfolgte eine Optimierung des Herstellungsprozesses, um den Durchmesser sowie die Größenverteilung der Seidenproteinpartikel zu reduzieren. Anstatt eines wässrigen Lösungsmittels wurde die ionische Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium Acetat (EMiM[Acetat]) verwendet. Wegen der einfachen Handhabung erfolgte die Mischung der Protein/EMiM[Acetat]-Lösung mit dem Fäll-Reagenz mittels Pipette. Mit dieser Technik konnten Partikel mit deutlich kleinerem Durchmesser und einer homogenen Größenverteilung, wie bisher beschrieben ($332 \pm 95 \text{ nm}$), hergestellt werden (Teilarbeit I, Tabelle 2).^{306, 309} Es wurde mit anderen Materialien gezeigt, dass die Aufnahme von Partikeln mit einem Durchmesser von 100-200 nm am effizientesten erfolgt.^{213, 315-318} Dieses Durchmesser-Fenster konnte für die Spinnenseidenproteinpartikel nicht realisiert werden. Die mit der neuen Technik produzierten eADF4(C16)-Partikel weisen jedoch einen mittleren Durchmesser von $242 \pm 22 \text{ nm}$ auf, was dem Optimalbereich sehr nahe kommt.

Da die physikochemischen Eigenschaften sowie die Anwesenheit von Interaktionsmotiven auch eine wichtige Rolle spielen, wurden entsprechende Modifikationen der eADF4(C16)-Partikel untersucht. Hierzu wurde eADF4(C16) zur Verbesserung der Aufnahme der Spinnenseidenproteinpartikel mit verschiedenen ZPP (Tat-, R₈G-, RGD-Peptid) funktionalisiert (Abbildung 13). Zudem wurde das Tat-Peptid carboxyterminal, aminoterminal und an beiden Termini von eADF4(C16) kloniert um den Einfluss der Lokation des Peptids auf die Zellaufnahme zu analysieren.

Als dritte Strategie wurde die Aufnahme in Abhängigkeit der Netto-Ladung der Partikel untersucht. Dabei wurde zum einen das positiv geladene Spinnenseidenprotein eADF4(κ 16) verwendet, und zum anderen Mischpartikel (*blend*; Verhältnis 50:50) aus eADF4(C16) und eADF4(κ 16) hergestellt.

Aus allen oben genannten Proteinen lassen sich sphärische Partikel ohne erkennbaren Unterschied herstellen (Teilarbeit I, Abbildung 2A sowie ergänzende Abbildung 1). Die Partikel aus modifiziertem eADF4(C16) weisen einen mittleren Durchmesser von 239-282 nm

auf (Teilarbeit I, Tabelle 2), eADF4(κ 16) sowie *blend*-Partikel liegen jedoch mit 325 und 393 nm deutlich darüber.

Da für die erste Interaktion zwischen Partikeln und Zellen die physikochemischen Eigenschaften eine Rolle spielen, wurde das Zeta-Potential, welches Rückschlüsse auf die Oberflächenladung zulässt, analysiert (Teilarbeit I, Tabelle 2). Dabei wurde für Partikel aus eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, Tat-eADF4(C16) sowie eADF4(C16)Tat ein Oberflächenpotential zwischen -20 und -30 mV ermittelt. Durch das Einbringen positiv geladener Peptid-Motive zeigten eADF4(C16)R₈G- sowie Tat-eADF4(C16)Tat-Partikel deutlich niedrigere Oberflächenpotentiale von -17,1 bzw. -8,4 mV. eADF4(κ 16)-Partikel weisen als einziger Partikeltyp ein positives Oberflächenpotential (13,2 mV) auf. Die Mischpartikel zeigen eine große Varianz des Zeta-Potentials, da wahrscheinlich jeder Partikel aus verschiedenen Anteilen an eADF4(C16) und eADF4(κ 16) zusammengesetzt ist. Partikel, die ein Zeta-Potential niedriger als -20 mV aufweisen, neigen zu geringer Agglomeration.³¹⁹ Dies konnte mittels Analyse der kolloidalen Stabilität bestätigt werden (Teilarbeit I, Abbildung 2B).

Die Partikel-Aufnahme wurde mit HeLa-Zellen analysiert. Dazu wurde zuerst die Zellviabilität von HeLa-Zellen in Gegenwart der verschiedenen Spinnenseidenproteinpartikel untersucht. Es zeigte sich, dass die Partikel keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen haben (Teilarbeit I, Tabelle 3). Anschließend wurde die Aufnahme in Abhängigkeit der Zeit betrachtet (Abbildung 14A). Hierbei zeigte sich, dass eADF4(κ 16)-Partikel am effizientesten (nach 24 h: $92,2 \pm 7,4$ %) und eADF4(C16)-Partikel am wenigsten gut (nach 24 h: $19,0 \pm 6,7$ %) aufgenommen werden. *blend*- und modifizierte eADF4(C16)-Partikel liegen hinsichtlich ihrer Aufnahme durch die Zellen zwischen den eADF4(C16)- und eADF4(κ 16)-Partikeln. Dabei spielt es weder eine Rolle welche Art von Modifikation vorliegt noch, zumindest beim Tat-Peptid, wo die Modifikation an eADF4(C16) lokalisiert ist, oder in welcher Häufigkeit die Modifikation eingeführt ist. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Analysen nur noch Tat-eADF4(C16) anstelle aller drei Tat-modifizierten Proteine verwendet. Generell war nach 24 h die Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln am größten. Längere Inkubationszeiten führten nur bei eADF4(κ 16)- und *blend*-Partikeln zu einer weiteren, leichten Erhöhung der Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln (eADF4(κ 16): nach 6 h $63,9 \pm 15,5$ %, 24 h $92,2 \pm 7,4$ %, 48 h $95,7 \pm 4,7$ %, 72 h $97,2 \pm 2,9$ %; *blend*: nach 6 h $12,3 \pm 4,4$ %, 24 h $44,9 \pm 18,7$ %, 48 h $57,4 \pm 12,4$ %, 72 h $60,0 \pm 8,7$ %). Bei den meisten Partikeln nimmt die Anzahl an Zellen, bei denen die Partikelaufnahme nachgewiesen werden kann, bei längerer Inkubationszeit ab, was durch intrazellulären Abbau bedingt sein kann. Gleichzeitig fällt auf, dass

die Anzahl an Partikeln pro Zelle zunimmt, wenn eine effiziente Partikelaufnahme erfolgt (Abbildung 14B).

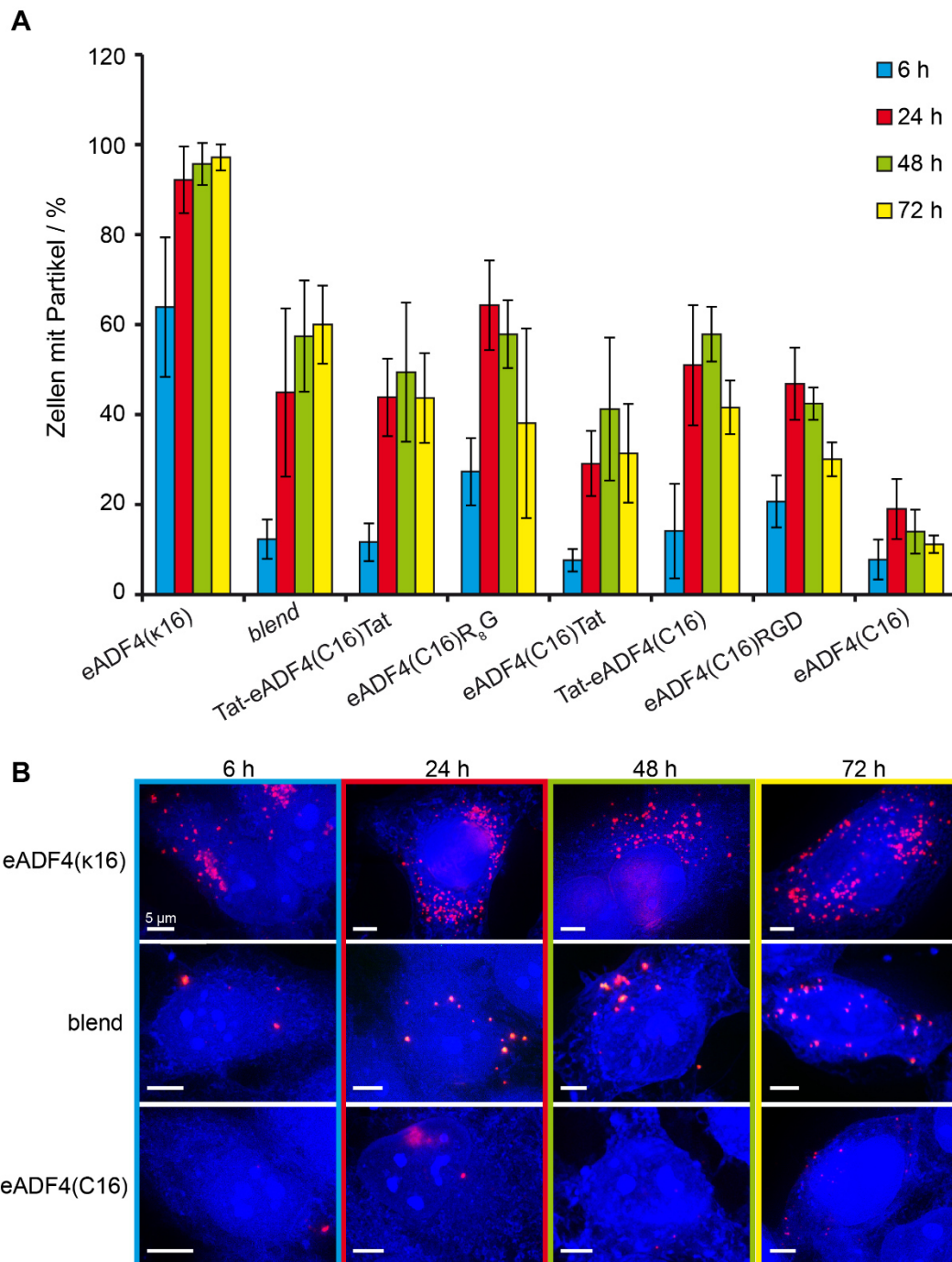


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse (A) und Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung (B; Maximalprojektionen) der Aufnahme von Spinnenseidenproteinpartikeln durch HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit einer Partikelkonzentration von 9,6 ng/ μ l für 6 h, 24 h, 48 h oder 72 h inkubiert und vor der durchflusszytometrischen Analyse mit Trypan-Blau behandelt, um die Fluoreszenz der Partikel auf der Zelloberfläche zu quenchen. Für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit HCS CellMaskTM gefärbt. Größenstandard: 5 μ m. Modifiziert nach Elsner et al., *Biomaterials Science*, 2015, 3, 543-551 mit freundlicher Genehmigung des Verlages *The Royal Society of Chemistry*.

Auch durch eine Erhöhung der Partikelkonzentration konnte die Aufnahme (Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln) gesteigert werden, außer bei eADF4(κ 16) (Abbildung 15). So konnten Partikel hergestellt aus eADF4(C16) R_8G , Tat-eADF4(C16) und eADF4(C16)RGD in bis zu 90 % der Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme von eADF4(C16)-Partikeln konnte ebenfalls gesteigert werden, jedoch wurde hier lediglich eine Erhöhung auf bis zu 40 % erzielt.

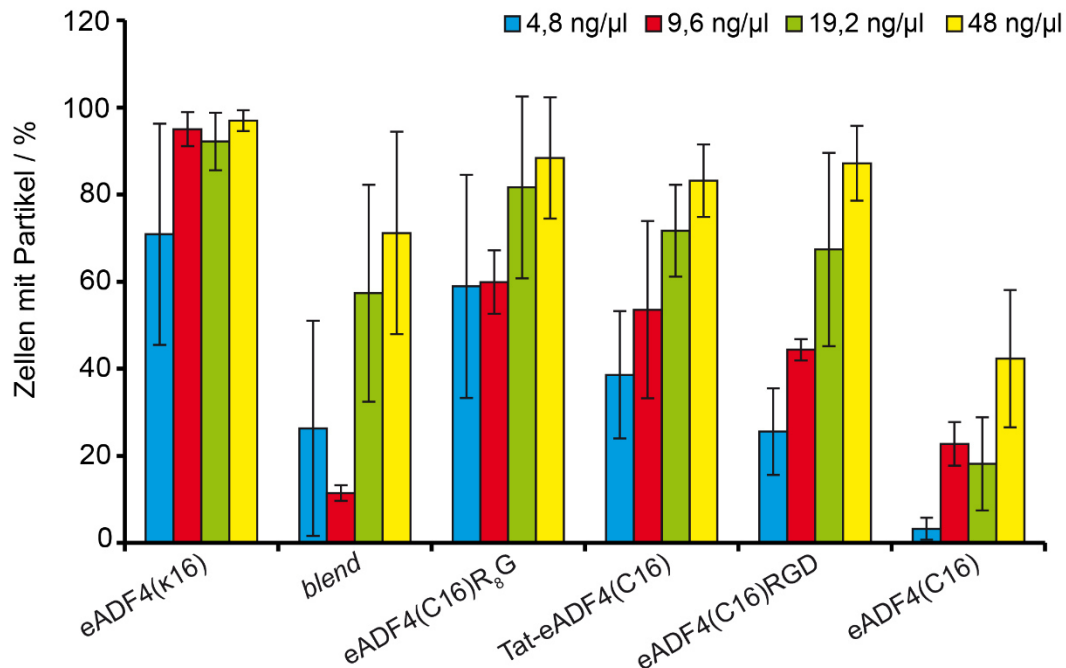


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Spinnenseidenproteinpartikeln durch HeLa-Zellen in Abhängigkeit der Partikelkonzentration. HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Partikelkonzentrationen für 24 h inkubiert und vor der Analyse mit Trypan-Blau behandelt, um die Fluoreszenz der Partikel auf der Zelloberfläche zu quenchen.

Anschließend wurde der mögliche Aufnahmeweg unter Verwendung von Endozytose-Inhibitoren untersucht (Tabelle 3, Teilarbeit I ergänzende Tabelle 1). Dazu wurden Inhibitoren gegen die Clathrin-vermittelte Endozytose (Dansylcadaverin [DC]) und Makropinozytose (Dimethyl-amilorid [DMA]) eingesetzt. Aufgrund der Größe der Partikel wurden keine Inhibitoren gegen die Caveolae-vermittelte Endozytose verwendet, da die endozytotische Vesikelgröße nur 50-80 nm beträgt.⁸⁶

Es konnten drei Gruppen in Bezug auf den Aufnahmemechanismus identifiziert werden. Die erste Gruppe beinhaltet eADF4(C16)-Partikel, wobei die Anzahl an Partikel-haltigen Zellen in Gegenwart beider Inhibitoren in gleichem Maße reduziert wird. Folglich spielen beide Endozytosewege eine gleich wichtige Rolle bei der Aufnahme von eADF4(C16)-Partikeln.

Die zweite Gruppe besteht aus Tat-eADF4(C16)-, eADF4(C16)RGD- und *blend*-Partikeln. Hier nimmt die Anzahl an Zellen mit Partikeln in Gegenwart des Inhibitors DC (Clathrin-vermittelte Endozytose) stärker ab, als in Gegenwart des Inhibitors DMA (Makropinozytose). Daraus lässt sich schließen, dass hier die Rolle der Clathrin-vermittelten Endozytose die wichtigere ist. Interessanterweise ist die Makropinozytose auch in die Aufnahme von eADF4(C16)RGD-Partikeln involviert. Das hier verwendete RGD wird hauptsächlich von $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha v\beta 3$ -Integrin erkannt. Bei diesen beiden Integrin-Rezeptoren konnte bereits im Vorfeld dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass diese von mehreren Endozytose-Mechanismen wie Clathrin-abhängiger als auch Clathrin-unabhängiger Endozytose aufgenommen werden.³²⁰⁻³²⁶

eADF4(κ 16)- und eADF4(C16)R₈G-Partikel zählen zur dritten Gruppe. Hier ist die Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln bei Verwendung des Inhibitors gegen die Clathrin-vermittelte Endozytose stark reduziert (mind. 50 %). Wird dagegen der Inhibitor gegen die Makropinozytose eingesetzt, so ist nur ein leichter Rückgang der Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln zu verzeichnen. Somit erfolgt bei diesen beiden Partikeln die Aufnahme primär über die Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Makropinozytose spielt hier offenbar nur eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 3: Aufnahme von Spinnenseidenproteinpartikeln in Gegenwart von Endozytose-Inhibitoren. 9,6 ng/ μ l an Spinnenseidenproteinpartikeln wurden in Gegenwart der Inhibitoren DC und DMA für 24 h inkubiert, und die Partikelaufnahme anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Modifiziert nach Elsner et al., *Biomaterials Science*, 2015, 3, 543-551 mit freundlicher Genehmigung des Verlages *The Royal Society of Chemistry*.

Spinnenseidenprotein-partikel	Zellen mit Partikeln / %		
	-	+ DC	+ DMA
eADF4(C16)	19,0 \pm 6,7	8,5 \pm 3,4	7,7 \pm 4,9
Tat-eADF4(C16)	51,0 \pm 13,4	11,1 \pm 0,6	26,7 \pm 15,7
eADF4(C16)RGD	46,9 \pm 8,0	19,9 \pm 10,5	33,7 \pm 8,4
<i>blend</i>	44,9 \pm 18,7	16,6 \pm 6,7	29,0 \pm 17,5
eADF4(C16)R ₈ G	64,5 \pm 9,9	23,4 \pm 5,9	63,7 \pm 14,9
eADF4(κ 16)	92,2 \pm 7,4	47,3 \pm 12,5	72,9 \pm 7,1

3.2 Einfluss der Beladung der Partikel auf die zelluläre Aufnahme

Die erste Interaktion eines Wirkstofftransportsystems mit der Zelle erfolgt in der Regel über elektrostatische und/oder hydrophobe Wechselwirkungen. Die äußere Schicht eines Spinnenseidenpartikels besteht aus einer diffusen Lage,³⁰⁷ welche von elektrostatischen Wechselwirkungen bestimmt ist und über die die erste Interaktion mit der Plasmamembran einer Zielzelle erfolgt. Befinden sich keine Erkennungssequenzen für Rezeptoren an den Partikeln, wird die Initiation der Aufnahme eines Partikels in die Zelle über diese elektrostatischen Wechselwirkungen bestimmt. Da die Plasmamembran einer Zelle negativ geladen ist (z.B. bei HeLa ~ -50 mV)³²⁷, wird, wie in der vorangehenden Teilarbeit gezeigt,²⁸³ die Aufnahme von positiv geladenen Partikeln begünstigt. Bei einer Beladung der Partikel kann auch die Ladung des Cargos einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Gesamtpartikel und somit auf die Aufnahmeeffizienz haben. Zur Ermittlung der Rolle der Cargo-Ladung bei der Partikelaufnahme wurden eADF4(κ 16)-, eADF4(C16)-, eADF4(C16)RGD- sowie eADF4(C16)R₈G-Partikel mit Modell-Wirkstoffen beladen und anschließend deren Aufnahme in HeLa-Zellen analysiert. Für eADF4(κ 16)-Partikel konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese Partikel *in vitro* mit kurzen Oligonukleotiden beladen lassen und diese auch wieder freisetzen können.²⁸⁴ In Teilarbeit II wurden die Partikel mit fluoreszenzmarkierter ssDNA (Fl-ODN) beladen, um den Einfluss dieser Beladung auf die Aufnahme durch HeLa-Zellen zu untersuchen (Abbildung 16). Zu der negativ geladenen ssDNA mit einer Größe von 7,3 kDa, wurde für die Beladung von negativ geladenen eADF4(C16)-, eADF4(C16)RGD- und eADF4(C16)R₈G-Partikeln ein positiv geladenes Polyethylenimin mit einem vergleichbaren Molekulargewicht gewählt. Auch hier wurde die Aufnahme der beladenen Partikel durch HeLa-Zellen untersucht (Abbildung 16).

Wie in Teilarbeit I wurden zuerst die Auswirkungen der beladenen Partikeln auf die Zellviabilität der HeLa-Zellen analysiert (Teilarbeit II, Abbildung 4). Dabei konnten keine zytotoxischen Auswirkungen auf die Zellen festgestellt werden. Anschließend erfolgte die Analyse der Aufnahme der beladenen Partikel. Bei einer Beladung von eADF4(C16)-Partikeln mit 2 μ M PEI-Fl konnten in 54,4 % der Zellen aufgenommene Partikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten bei einer Beladung von 0,1 und 0,5 μ M nur deutlich geringere Aufnahmeraten erreicht werden, wobei die Aufnahme bei einer Beladung von 0,5 μ M sogar niedriger als bei unbeladenen eADF4(C16)-Partikeln war.

eADF4(C16)RGD-Partikel zeigten unbeladen eine Aufnahmerate, die zwischen der von unbeladenen eADF4(C16)- und eADF4(κ 16)-Partikel liegt (Abbildung 14 und Tabelle 3,

Teilarbeit I, Abbildung 3 sowie Tabelle 4). Durch eine Beladung mit PEI-FI konnte die Aufnahme dieser Partikel bei niedrigeren Beladungskonzentrationen (0,1 bzw. 0,5 μM) signifikant auf ca. 70 % und bei einer höheren Beladungskonzentration (2 μM) auf 87,7 % erhöht werden. Bei unbeladenen eADF4(C16)RGD-Partikeln wurde die Aufnahme hauptsächlich durch das RGD-Motiv bestimmt und basierte somit auf einer spezifischen Interaktion der Partikel mit den Zellen. Durch die Beladung der eADF4(C16)RGD-Partikel mit PEI-FI befanden sich mehr positive Ladungen an der Oberfläche der Partikel, was zu einer Begünstigung der unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Zellen führte. Somit ermöglicht die Kombination von spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen eine Erhöhung der Aufnahmerate, wobei dies in den Analysen zur Oberflächenladung nicht bestätigt werden konnte (Teilarbeit II, Tabelle 1). Die Beladung von eADF4(C16) R_8G -Partikeln resultiert jedoch nicht wie bei eADF4(C16)RGD in einer höheren Aufnahmerate, sondern in einer signifikant reduzierten Aufnahmeeffizienz. Daraus lässt sich schließen, dass die Aufnahme von unbeladenen eADF4(C16) R_8G -Partikeln durch Ladung bestimmt war. Eine Erhöhung der Beladungskonzentration zeugt allerdings auch hier eine signifikante Steigerung der Aufnahmeeffizienz im Vergleich zu niedrigeren Beladungskonzentrationen.

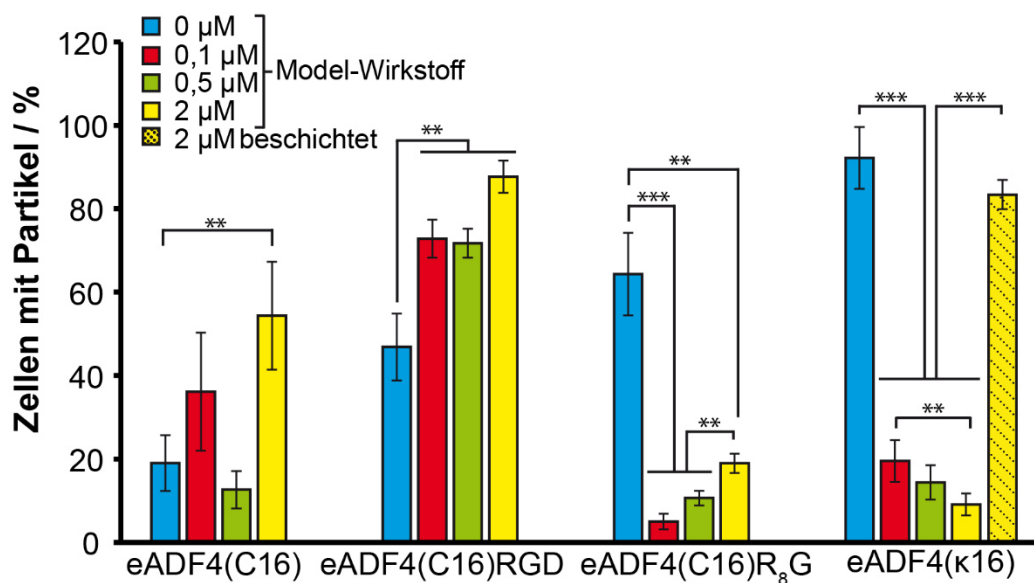


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von beladenen Spinnenseidenproteinpartikeln durch HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit einer Partikelkonzentration von 9,6 ng/ μl für 24 h inkubiert und vor der durchflusszytometrischen Analyse mit Trypan-Blau behandelt, um die Fluoreszenz der Partikel an der Zelloberfläche zu quenchen. Die Beladung erfolgte mit 0, 0,1, 0,5 und 2 μM FI-ODN (eADF4(κ 16)) oder dem Modell-Wirkstoff PEI-FI (eADF4(C16); eADF4(C16)RGD; eADF4(C16) R_8G). ** signifikant; *** höchst signifikant (Vergleich von zwei Mittelwerten, 2-Seiten-t-Test)³²⁸.

eADF4(κ 16)-Partikel werden nach einer Beladung mit FI-ODN signifikant schlechter aufgenommen als unbeladene. Dabei zeigt sich auch eine Abhängigkeit der reduzierten Aufnahme der Partikel von der Beladungskonzentration. Wie bei eADF4(C16) R_8 G-Partikeln ist auch hier die Reduzierung der Aufnahme vermutlich auf den Beladungsmechanismus zurückzuführen. Die Beladung der Partikel erfolgt mittels Diffusion, wobei die Partikel in der FI-ODN bzw. PEI-FI Lösung inkubiert wurden. Die Cargo-Moleküle diffundieren zwar in die Partikel ein, lagern sich aber auch an der Oberfläche der Partikel ab, wodurch sich die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel veränderte (Teilarbeit II, Tabelle 1). Bei eADF4(C16) R_8 G-Partikel führte dies bei niedrigen PEI-FI-Konzentrationen vermutlich dazu, dass das ZPP abgeschirmt wird und somit keine penetrierende Funktion mehr auftritt, die PEI-FI-Konzentrationen an der Oberfläche aber gleichzeitig für eine Induktion der Aufnahme zu gering ist.^{329, 330} eADF4(κ 16)-Partikel weisen nach der Beladung auch DNA an ihrer Oberfläche auf, sodass hier im Vergleich zu unbeladenen Partikeln eine negativere Oberflächenladung (Beladungskonzentration 2 μ M) entsteht (Teilarbeit II, Tabelle 1). Durch eine Beschichtung des beladenen eADF4(κ 16) Partikels mit einer zusätzlichen eADF4(κ 16)-Schicht konnte die Aufnahme der Partikel durch die Zellen wieder fast bis zur ursprünglichen Aufnahmeeffizienz der unbeladenen Partikel erhöht werden. Mittels Fluoreszenz-mikroskopischer Analysen konnte, wie bei Teilarbeit I, gezeigt werden, dass bei schlechter Aufnahme (Zahl an Zellen mit Partikeln) auch die Anzahl an Partikeln pro Zelle niedrig und bei hoher Aufnahme die Anzahl an Partikeln pro Zelle hoch ist (Teilarbeit II, Abbildung 3).

Für die Analyse des zugrunde liegenden Aufnahmemechanismus wurden HeLa-Zellen wie in Teilarbeit I (Tabelle 3) mit beladenen Partikeln, und Endozytose-Inhibitoren gegen die Clathrin-vermittelte Endozytose (DC) und die Makropinozytose (DMA) kultiviert (Tabelle 4). Die Aufnahme von unbeladenen eADF4(C16)-Partikeln ist in Gegenwart von DC und DMA gleichermaßen reduziert (siehe Teilarbeit I). Mit PEI-FI beladene eADF4(C16)-Partikel werden jedoch in Gegenwart des Makropinozytose-Inhibitors DMA von deutlich weniger Zellen aufgenommen als nach Zugabe des Clathrin-vermittelten Endozytose Inhibitors DC. Hier spielt die Makropinozytose eine größere Rolle als die Clathrin-vermittelte Endozytose. eADF4(C16)RGD- und eADF4(C16) R_8 G-Partikel werden bei geringer Beladungskonzentration in Gegenwart des Clathrin-vermittelten Endozytose Inhibitors stets von weniger Zellen aufgenommen als in Gegenwart des Inhibitors für die Makropinozytose. Somit spielt hier die Clathrin-vermittelte Endozytose eine größere Rolle als die Makropinozytose, im Vergleich zu unbeladenen Partikeln ist jedoch die Reduzierung der

Aufnahmerate in Gegenwart des Clathrin-vermittelte Endozytose Inhibitors geringer. Bei der höchsten Beladungskonzentration ist die Aufnahme der eADF4(C16)RGD-Partikel in Gegenwart von DC stärker reduziert als in Gegenwart von DMA und somit stellt auch hier die Clathrin-vermittelte Endozytose den Hauptaufnahmeweg dar. Dies deutet darauf hin, dass bei unbeladenen Partikeln die Aufnahme im Vergleich zu beladenen Partikeln spezifischer, also über das RGD-Peptid, abläuft. Die Aufnahme von unbeladenen eADF4(C16)R₈G-Partikeln ist bei höheren Beladungskonzentrationen in Gegenwart des Makropinozytose-Inhibitors deutlich geringer als in Gegenwart des Clathrin-vermittelten Endozytose Inhibitors, somit dominiert hier die Makropinozytose.

Tabelle 4: Aufnahme von beladenen Spinnenseidenproteinpartikeln in Gegenwart von Endozytose-Inhibitoren. 9,6 ng/μl beladener Spinnenseidenproteinpartikel wurden in Gegenwart von Inhibitoren für die Clathrin-vermittelte Endozytose (DC) oder Makropinozytose (DMA) für 24 h inkubiert. Die Aufnahme wurde anschließend mittels Durchflussszytometrie bestimmt.

Substanz	Partikel	Konzentration / μM	Zellen mit Partikeln / %		
			-	DC	DMA
PEI-FI	eADF4(C16)	0	17,1 ± 5,0	9,0 ± 4,0	8,7 ± 5,2
		0,1	36,1 ± 14,2	7,1 ± 3,6	15,0 ± 0,2
		0,5	12,6 ± 4,5	12,0 ± 3,7	4,7 ± 2,0
		2	54,4 ± 12,9	36,3 ± 4,0	26,5 ± 6,8
	eADF4(C16)RGD	0	51,4 ± 11,8	20,4 ± 10,9	34,3 ± 8,6
		0,1	72,8 ± 4,6	58,8 ± 4,8	69,4 ± 7,5
		0,5	71,7 ± 3,5	53,1 ± 6,3	57,1 ± 11,2
		2	87,7 ± 3,9	69,6 ± 2,6	78,6 ± 2,5
	eADF4(C16)R ₈ G	0	69,0 ± 11,7	23,9 ± 6,3	63,9 ± 15,1
		0,1	5,0 ± 1,9	2,3 ± 1,1	3,3 ± 0,9
		0,5	10,6 ± 1,8	5,0 ± 3,9	5,3 ± 1,0
		2	18,9 ± 2,3	15,2 ± 1,3	9,0 ± 2,1
FI-ODN	eADF4(κ16)	0	94,5 ± 3,2	47,8 ± 13,0	73,9 ± 7,5
		0,1	19,5 ± 5,0	1,2 ± 0,3	8,5 ± 3,8
		0,5	14,4 ± 4,1	0,9 ± 0,1	6,7 ± 2,7
		2	9,1 ± 2,6	0,8 ± 0,2	3,6 ± 1,1
	eADF4(κ16) coated	2	83,4 ± 3,5	45,1 ± 13,7	58,4 ± 1,7

Die meisten verwendeten Wirkstoffe, vor allem in der Krebs-Therapie, sind positiv geladene Verbindungen. Da nieder-molekulare neutrale und leicht positiv geladene Verbindungen aus eADF4(C16)-Partikeln sehr schnell heraus diffundieren und eADF4(C16) gleichzeitig eine

schlechte Aufnahmerate in Zellen aufweist (Teilarbeit I),^{283, 284, 309, 311} wurde nach einer Lösung gesucht, positiv geladene Wirkstoffe in eADF4(κ 16)-Partikeln zu verpacken. Die leicht positiv geladene Verbindung Doxorubicin (Dox), ein bereits in der Krebstherapie etablierter Wirkstoff, kann in DNA interkalieren sowie Topoisomerase II inhibieren und wirkt somit zytostatisch.³³¹ Auf dieser Basis wurde Doxorubicin mit Plasmid-DNA inkubiert und eADF4(κ 16)-Partikel mit dem Komplex DNA/Dox beladen. Die Partikel wurden anschließend für eine effizientere Aufnahme erneut mit eADF4(κ 16) beschichtet. HeLa-Zellen, die mit 9,6 ng/ μ l DNA/Dox-beladenen eADF4(κ 16)-Partikel (Dox-Konzentration ca. 2 μ M) inkubiert wurden, zeigten nach 6 h keine Verringerung ihrer Viabilität (Abbildung 17). Nach 24 und 48 h reagierten die Zellen auf das Dox in den Partikeln und zeigten eine leicht verringerte Viabilität (Dox-Konzentration: 2 μ M; 24 h: 85 ± 11 %; 48 h: 50 ± 11 %), jedoch war die Viabilität im Vergleich zu freiem Dox (24 h: 16 ± 9 %; 48 h: 2 ± 3 %) höher. Durch eine Erhöhung der Konzentration DNA/Dox-beladener Partikel auf 48 ng/ μ l (Dox-Konzentration ca. 10 μ M) zeigten die Zellen schon nach 24 h eine deutliche Reduzierung ihrer Viabilität (21 ± 6 %), die etwa im gleichen Bereich der für freies Dox erzielten Ergebnisse (Dox-Konzentration 10 μ M; 17 ± 3 %) lag. Wird die Partikelkonzentration noch weiter gesteigert (96 ng/ μ l; Dox-Konzentration ca. 20 μ M), kann sogar eine signifikant niedrigere Zellviabilität (8 ± 1 %) im Vergleich zu freiem Dox (Dox-Konzentration: 20 μ M; 22 ± 5 %) detektiert werden. Nach 48 h konnte kein Unterschied in der Zellviabilitäts-Reduzierung zwischen freiem Dox und DNA/Dox beladenen eADF4(κ 16)-Partikeln gemessen werden (Zellviabilität in beiden Fällen nahezu Null).

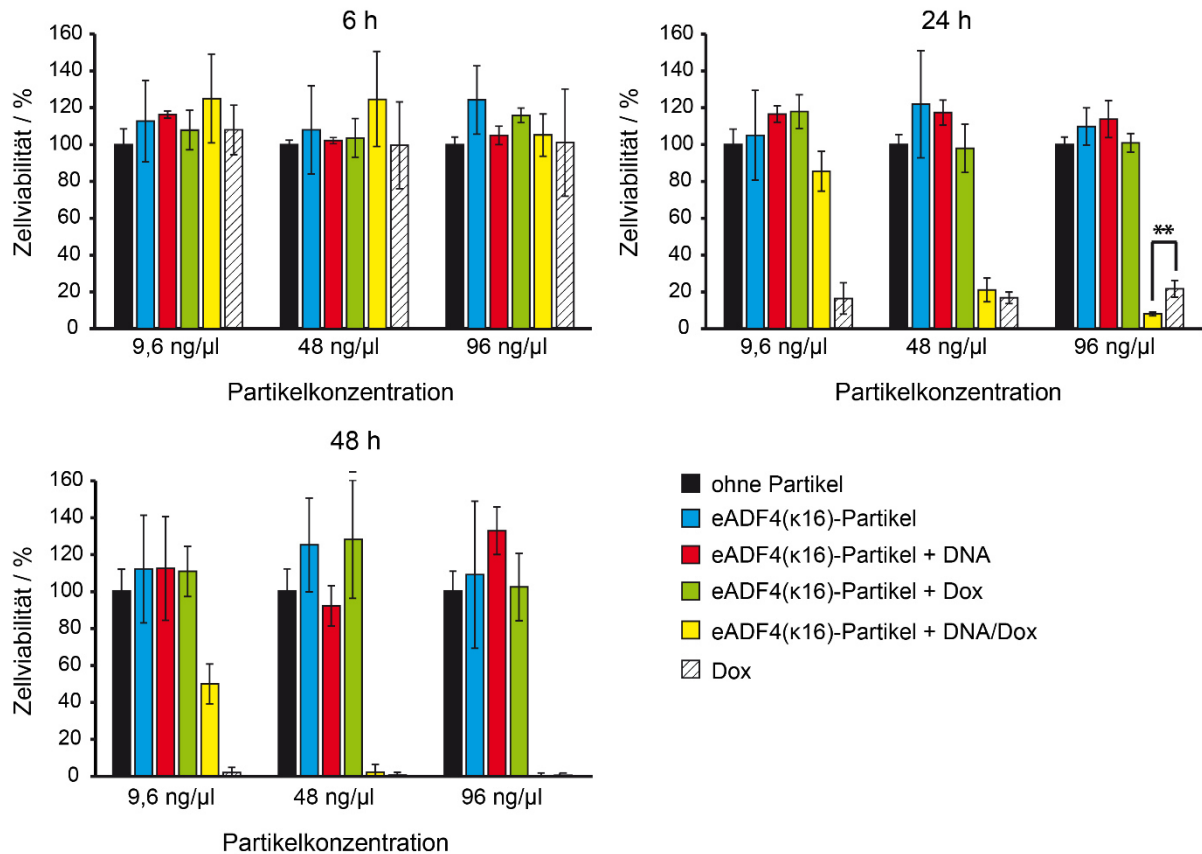


Abbildung 17: Zellviabilität von HeLa-Zellen in Gegenwart DNA, Dox oder DNA/Dox beladener eADF4(κ16)-Partikeln sowie freiem Dox. HeLa-Zellen wurden mit 9,6, 48 oder 96 ng/μl der DNA, Dox oder DNA/Dox beladenen eADF4(κ16)-Partikeln (Dox-Konzentrationen ca. 2, 10 und 20 μM) für 6, 24 und 48 h bei 37 °C kultiviert. Als Kontrolle wurden zusätzlich die Zellviabilität der HeLa-Zellen alleine sowie in Gegenwart von freiem Dox (Dox-Konzentrationen: 2, 10 und 20 μM) untersucht. Die Zellviabilität wurde mit dem CellTiter Blue Assay bestimmt und in Bezug auf die Viabilität von HeLa-Zellen, die nicht mit Partikeln inkubiert wurden, gesetzt (100 %). ** signifikant (Vergleich von zwei Mittelwerten, 2-Seiten-t-Test).³²⁸

Die Freisetzung von Dox innerhalb der Zellen erfolgt vermutlich durch den Abbau der DNA und der Partikel (Teilarbeit II, Abbildung 5), da sich die Freisetzung nach DNaseI- und Trypsin-Zugabe *in vitro* um ca. 10 % erhöht. Dieser Effekt konnte ohne Enzymzugabe nicht detektiert werden. eADF4(κ16)-Partikel beladen mit DNA oder Dox alleine resultieren nicht in einer reduzierten Zellviabilität, da Dox aufgrund der elektrostatischen Abstoßung während des Beschichtungsprozesses aus den Partikeln wieder herausgewaschen wird.

Zusätzlich wurden DNA/Dox beladene Partikel auch mit der Neuroblastoma-Zelllinie Kelly und BALB/3T3 Fibroblasten getestet (Teilarbeit II, Abbildung 4). Hier zeigte sich, dass die Kelly Zelllinie nach 6 h ebenso wie die HeLa-Zellen keine Reaktion auf mit 9,6 oder 48 ng/μl DNA/Dox beladene eADF4(κ16)-Partikel zeigten. Bei einer Partikelkonzentration von 9,6 ng/μl konnte nach 24 h kein und nach 48 h ein geringer Effekt der DNA/Dox beladenen

Partikel auf die Zellviabilität ($45 \pm 15 \%$) detektiert werden. Bei der höchsten Konzentration ($96 \text{ ng}/\mu\text{l}$) war die Zellviabilität nach 24 h in der Gegenwart der DNA/Dox beladenen eADF4($\kappa 16$)-Partikel erniedrigt ($24 \pm 7 \%$), jedoch höher als in Gegenwart von freiem Dox ($3 \pm 7 \%$). Nach 48 h war der Effekt auf die Viabilität bei DNA/Dox beladenen eADF4($\kappa 16$)-Partikeln so stark wie die Auswirkungen von freiem Dox (Zellviabilität in beiden Fällen nahezu Null). Auch bei BALB/3T3 Fibroblasten konnte nach 6 h kein Effekt von allen beladenen Partikeltypen auf die Viabilität der Zellen detektiert werden. Nach 24 h zeigte sich zwar ein leichter Rückgang der Zellviabilität für DNA bzw. Dox beladene Partikel, die Viabilität war aber nach 48 h wieder auf dem gleichen Level wie bei unbehandelten Zellen. Bei der Inkubation von BALB/3T3 Fibroblasten in Gegenwart DNA/Dox beladener eADF4($\kappa 16$)-Partikel in einer Konzentration von $9,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ konnte nach 24 h ein leichter Rückgang der Viabilität ($63 \pm 9 \%$) verzeichnet werden. Dieser Effekt nimmt mit zunehmender Partikelkonzentration zu ($48 \text{ ng}/\mu\text{l}$: $26 \pm 4 \%$; $96 \text{ ng}/\mu\text{l}$: $23 \pm 6 \%$), ist jedoch stets geringer als der Effekt des freien Dox ($9,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$: $27 \pm 12 \%$; $48 \text{ ng}/\mu\text{l}$: $19 \pm 5 \%$; $96 \text{ ng}/\mu\text{l}$: $18 \pm 5 \%$). Bei höheren Konzentrationen und nach einer Inkubationszeit von 48 h konnten weder für freies Dox noch für DNA/Dox beladene eADF4($\kappa 16$)-Partikel lebende Zellen detektiert werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass HeLa-Zellen offenbar eine höhere Sensitivität gegen DNA/Dox beladene eADF4($\kappa 16$)-Partikel aufweisen als die anderen verwendeten Zelllinien. Auch reagieren sie nicht auf unbeladene und mit den Einzelkomponenten beladene Partikel, die als Kontrolle eingesetzt wurden.

Die Aufnahme von eADF4(C16)-Partikeln durch Säugerzellen erwies sich als wenig effizient. Durch das Einbringen von ZPP oder Ladungsänderung konnte die Aufnahme gesteigert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt lässt sich die Aufnahme auch durch die Beladung von Partikeln mit spezifischen Wirkstoffen zum Teil erhöhen, bei einigen Partikel-Wirkstoff-Kombinationen ist aber auch eine Reduzierung der Aufnahmeeffizienz zu erkennen. Durch die Beladung von eADF4(C16)RGD-Partikeln mit PEI-FI konnte die Anzahl an Zellen mit aufgenommenen Partikeln fast verdoppelt werden (synergetischer Effekt). Im Gegenteil dazu führt die Beladung von eADF4(C16)R₈G- und eADF4($\kappa 16$)-Partikeln zu einer deutlich niedrigeren Aufnahme der Partikel durch die eingesetzte Zelllinie. Mittels einer nachträglichen Beschichtung der beladenen Partikel kann dieser negative Effekt jedoch wieder rückgängig gemacht werden.

Die Beladung erhöht den Anteil unspezifischer Interaktionen zwischen Zellen und Partikeln, was einen Einfluss auf den Mechanismus der zellulären Partikelaufnahme hat. So erhöht sich

in einigen Fällen die Rolle der Makropinozytose, der Hauptaufnahmeweg der Partikel bleibt jedoch die Clathrin-vermittelte Endozytose.

Gerade im Bereich der Chemotherapie ist die Ausbildung von multiplen Wirkstoff-Resistenzen ein großes Problem. Die hier verwendeten DNA/Dox beladenen eADF4(κ 16)-Partikel werden einfach von Zellen aufgenommen, schützen gleichzeitig die DNA vor Abbau außerhalb der Zelle und ermöglichen die Freisetzung von Dox erst innerhalb der Zelle. Da Spinnenseide sowie die rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteine keine immunogene oder allergene Wirkung zeigen, stellen diese Proteine zusammen mit den hier präsentierten Ergebnissen ein vielversprechendes Material für einen zukünftigen Einsatz als Wirkstofftransportsystem dar.^{297, 332}

4. Literaturverzeichnis

1. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. and Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 8. Auflage edn., 2001.
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L., *Biochemie*, Springer Spektrum, Heidelberg, 7. Auflage edn., 2013.
3. European Medicine Agency, *Guideline on Pharmaceutical Development of Medicines for Paediatric Use*, EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2, 2012.
4. WHO, in *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*, ed. WHO, World Health Organisation, Geneva, 2012, pp. 1-250.
5. European Medicines Agency (CHMP), *Reflection Paper: Formulations of Choice for the Paediatric Population*, EMEA/CHMP/PEG/194810/2005, 2005.
6. Breitkreuz, J., Weesel, T. and Boos, J., in *Introduction to Paediatric and Perinatal Drug Therapy*, eds. Choonar, I., Nunn, A. J. and Kearns, G., Nottingham University Press, Nottingham, 2003, ch. 13, pp. 189-205.
7. Sam, T., Ernest, T. B., Walsh, J. and Williams, J. L., *A benefit/risk approach towards selecting appropriate pharmaceutical dosage forms - an application for paediatric dosage form selection*, Int. J. Pharm., 2012, 435, 115-123.
8. Shea, K. M., *Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers*, Pediatrics, 2003, 111, 1467-1474.
9. Haishima, Y., Matsuda, R., Hayashi, Y., Hasegawa, C., Yagami, T. and Tsuchiya, T., *Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy*, Int. J. Pharm., 2004, 274, 119-129.
10. Allegaert, K., Anderson, B. J., Vrancken, M., Debeer, A., Desmet, K., Cosaert, K., Tibboel, D. and Devlieger, H., *Impact of a paediatric vial on the magnitude of systematic medication errors in neonates*, Paediatric and Perinatal Drug Therapy, 2006, 7, 59-63.
11. Williams, A., *Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice*, Pharmaceutical Press, London, 2003.
12. Potts, R. O., Buras, E. M., Jr. and Chrisman, D. A., Jr., *Changes with age in the moisture content of human skin*, J. Invest. Dermatol., 1984, 82, 97-100.
13. Weigand, D. A., Haygood, C. and Gaylor, J. R., *Cell Layers and Density of Negro and Caucasian Stratum Corneum*, J. Invest. Dermatol., 1974, 62, 563-568.
14. Reinertson, R. P. and Wheatley, V. R., *Studies on the Chemical Composition of Human Epidermal Lipids*, J. Invest. Dermatol., 1959, 32, 49-59.
15. Sun, Y., in *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*, eds. Gosh, T. K., Pfister, W. R. and Yum, S. I., Interpharm Press, Buffalo Grove, 1997.
16. Jackson, E. W., in *Skin Permeation, Fundamentals and Application*, ed. Zatz, J. L., Allured Publishing Corporation, Wheaton, 1993.
17. Gupta, S. K., Sathyan, G. and Hwang, S. S., in *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*, eds. Gosh, T. K., Pfister, W. R. and Yum, S. I., Interpharm Press, Buffalo Grove, 1997, pp. 215-548.
18. Tojo, K., in *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*, eds. Gosh, T. K., Pfister, W. R. and Yum, S. I., Interpharm Press, Buffalo Grove, 1997, pp. 113-138.
19. Flynn, G. L., in *Percutaneous Absorption: Mechanism Methodology Drug Delivery*, eds. Bronaugh, R. L. and Maibach, H. I., Marcel Dekker Inc., New York, 2 edn., 1989, pp. 57-51.

20. Lenneras, H., *Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo*, Adv. Drug Delivery Rev., 2007, 59, 1103-1120.
21. Brodin, B., Nielsen, C. U., Steffansen, B. and Frokjaer, S., *Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal Di/tri-peptide transporter, PepT1*, Pharmacol. Toxicol., 2002, 90, 285-296.
22. Park, J. W., Kim, S. K., Al-Hilal, T. A., Jeon, O. C., Moon, H. T. and Byun, Y., *Strategies for Oral Delivery of Macromolecule Drugs*, Biotechnol. Bioprocess Eng., 2010, 15, 66-75.
23. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. and Hori, K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*, J. Control. Release, 2000, 65, 271-284.
24. Leemann, T. D., Transon, C., Bonnabry, P. and Dayer, P., *A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs*, Drugs Exp. Clin. Res., 1993, 19, 189-195.
25. Zanger, U. M. and Schwab, M., *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*, Pharmacol. Ther., 2013, 138, 103-141.
26. Hamman, M. A., Thompson, G. A. and Hall, S. D., *Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C*, Biochem. Pharmacol., 1997, 54, 33-41.
27. Sandor, V., Fojo, T. and Bates, S. E., *Future perspectives for the development of P-glycoprotein modulators*, Drug Resist. Updat., 1998, 1, 190-200.
28. Bates, S. E., *Drug resistance: still on the learning curve*, Clin. Cancer Res., 1999, 5, 3346-3348.
29. Verweij, J. and de Vries, E. G., *Clinical cancer research 2001: new agents and therapies*, Drug Resist. Updat., 2001, 4, 217-223.
30. Dano, K., *Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells*, Biochim. Biophys. Acta, 1973, 323, 466-483.
31. Morita, Y., Sobel, M. L. and Poole, K., *Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product*, J. Bacteriol., 2006, 188, 1847-1855.
32. Molnar, J., Engi, H., Hohmann, J., Molnar, P., Deli, J., Wesolowska, O., Michalak, K. and Wang, Q., *Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants*, Curr. Top. Med. Chem., 2010, 10, 1757-1768.
33. Riordan, J. R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J. and Ling, V., *Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines*, Nature, 1985, 316, 817-819.
34. Kapse-Mistry, S., Govender, T., Srivastava, R. and Yergeri, M., *Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells*, Front. Pharmacol., 2014, 5.
35. Hazlehurst, L. A., Damiano, J. S., Buyuksal, I., Pledger, W. J. and Dalton, W. S., *Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR)*, Oncogene, 2000, 19, 4319-4327.
36. Aoudjit, F. and Vuori, K., *Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells*, Oncogene, 2001, 20, 4995-5004.
37. Broxterman, H. J., Lankelma, J. and Hoekman, K., *Resistance to cytotoxic and anti-angiogenic anticancer agents: similarities and differences*, Drug Resist. Updat., 2003, 6, 111-127.
38. Milane, L., Ganesh, S., Shah, S., Duan, Z. F. and Amiji, M., *Multi-modal strategies for overcoming tumor drug resistance: hypoxia, the Warburg effect, stem cells, and multifunctional nanotechnology*, J. Control. Release, 2011, 155, 237-247.

39. Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J., *Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997, 94, 8104-8109.
40. Nadali, F., Pourfathollah, A. A., Alimoghaddam, K., Nikougoftar, M., Rostami, S., Dizaji, A., Azizi, E., Zomorodipour, A. and Ghavamzadeh, A., *Multidrug resistance inhibition by antisense oligonucleotide against MDR1/mRNA in P-glycoprotein expressing leukemic cells*, Hematology, 2007, 12, 393-401.
41. Ren, Y., Wang, Y., Zhang, Y. and Wei, D., *Overcoming multidrug resistance in human carcinoma cells by an antisense oligodeoxynucleotide--doxorubicin conjugate in vitro and in vivo*, Mol. Pharm., 2008, 5, 579-587.
42. Nieth, C., Priebisch, A., Stege, A. and Lage, H., *Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi)*, FEBS Lett., 2003, 545, 144-150.
43. Wu, C. P., Calcagno, A. M. and Ambudkar, S. V., *Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies*, Curr. Mol. Pharmacol., 2008, 1, 93-105.
44. Tomida, A. and Tsuruo, T., in *Anticancer drug development*, eds. Baguley, B. C. and Kerr, D. J., Tokyo: Academic Press, Tokyo, 2002, pp. 77-90.
45. Watanabe, T., Naito, M., Kokubu, N. and Tsuruo, T., *Regression of established tumors expressing P-glycoprotein by combinations of adriamycin, cyclosporin derivatives, and MRK-16 antibodies*, J. Natl. Cancer Inst., 1997, 89, 512-518.
46. Goda, K., Fenyvesi, F., Bacso, Z., Nagy, H., Marian, T., Megyeri, A., Krasznai, Z., Juhasz, I., Vecsernyes, M. and Szabo, G., Jr., *Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2007, 320, 81-88.
47. Shionoya, M., Jimbo, T., Kitagawa, M., Soga, T. and Tohgo, A., *DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro and in vivo*, Cancer Sci., 2003, 94, 459-466.
48. Altstadt, T. J., Fairchild, C. R., Golik, J., Johnston, K. A., Kadow, J. F., Lee, F. Y., Long, B. H., Rose, W. C., Vyas, D. M., Wong, H., Wu, M. J. and Wittman, M. D., *Synthesis and antitumor activity of novel C-7 paclitaxel ethers: discovery of BMS-184476*, J. Med. Chem., 2001, 44, 4577-4583.
49. Rose, W. C., Fairchild, C. and Lee, F. Y., *Preclinical antitumor activity of two novel taxanes*, Cancer Chemother. Pharmacol., 2001, 47, 97-105.
50. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S. and Shakesheff, K. M., *Polymeric systems for controlled drug release*, Chem. Rev., 1999, 99, 3181-3198.
51. Hoeller, D., Volarevic, S. and Dikic, I., *Compartmentalization of growth factor receptor signalling*, Curr. Opin. Cell Biol., 2005, 17, 107-111.
52. Doherty, G. J. and McMahon, H. T., *Mechanisms of endocytosis*, Annu. Rev. Biochem., 2009, 78, 857-902.
53. Kaksonen, M., Toret, C. P. and Drubin, D. G., *A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery*, Cell, 2005, 123, 305-320.
54. Taylor, M. J., Perrais, D. and Merrifield, C. J., *A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis*, PLoS Biol., 2011, 9, e1000604.
55. Kirchhausen, T. and Harrison, S. C., *Protein organization in clathrin trimers*, Cell, 1981, 23, 755-761.
56. Ungewickell, E. and Branton, D., *Assembly units of clathrin coats*, Nature, 1981, 289, 420-422.

-
57. Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T. and Walz, T., *Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy*, Nature, 2004, 432, 573-579.
 58. Rapoport, I., Boll, W., Yu, A., Bocking, T. and Kirchhausen, T., *A motif in the clathrin heavy chain required for the Hsc70/auxilin uncoating reaction*, Mol. Biol. Cell, 2008, 19, 405-413.
 59. Böcking, T., Aguet, F., Harrison, S. C. and Kirchhausen, T., *Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating*, Nat. Struct. Mol. Biol., 2011, 18, 295-301.
 60. Traub, L. M., *Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2009, 10, 583-596.
 61. Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. and Robinson, M. S., *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*, J. Cell Biol., 2003, 162, 909-918.
 62. Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W. and Sorkin, A., *Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference*, J. Biol. Chem., 2004, 279, 16657-16661.
 63. Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R. and McMahon, H. T., *A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain*, Cell, 1999, 97, 805-815.
 64. Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T. and Evans, P. R., *The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain*, EMBO J., 2000, 19, 4216-4227.
 65. Praefcke, G. J., Ford, M. G., Schmid, E. M., Olesen, L. E., Gallop, J. L., Peak-Chew, S. Y., Vallis, Y., Babu, M. M., Mills, I. G. and McMahon, H. T., *Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis*, EMBO J., 2004, 23, 4371-4383.
 66. Schmid, E. M., Ford, M. G., Burtey, A., Praefcke, G. J., Peak-Chew, S. Y., Mills, I. G., Benmerah, A. and McMahon, H. T., *Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly*, PLoS Biol., 2006, 4, e262.
 67. Keyel, P. A., Thieman, J. R., Roth, R., Erkan, E., Everett, E. T., Watkins, S. C., Heuser, J. E. and Traub, L. M., *The AP-2 adaptor beta2 appendage scaffolds alternate cargo endocytosis*, Mol. Biol. Cell, 2008, 19, 5309-5326.
 68. Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S. and Kirchhausen, T., *The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit*, Cell, 2012, 150, 495-507.
 69. Traub, L. M. and Bonifacino, J. S., *Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis*, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2013, 5, a016790.
 70. Merrifield, C. J. and Kaksonen, M., *Endocytic accessory factors and regulation of clathrin-mediated endocytosis*, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2014, 6, a016733.
 71. ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S. C. and Kirchhausen, T., *Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker*, Cell, 1998, 95, 563-573.
 72. Drake, M. T., Downs, M. A. and Traub, L. M., *Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites*, J. Biol. Chem., 2000, 275, 6479-6489.
 73. Drake, M. T. and Traub, L. M., *Interaction of two structurally distinct sequence types with the clathrin terminal domain beta-propeller*, J. Biol. Chem., 2001, 276, 28700-28709.
 74. Miele, A. E., Watson, P. J., Evans, P. R., Traub, L. M. and Owen, D. J., *Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain beta-propeller*, Nat. Struct. Mol. Biol., 2004, 11, 242-248.

75. Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L. and Dyda, F., *G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity*, Nature, 2010, 465, 435-440.
76. Chappie, J. S., Mears, J. A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S. L., Milligan, R. A., Hinshaw, J. E. and Dyda, F., *A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke*, Cell, 2011, 147, 209-222.
77. Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L. and Kirchhausen, T., *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*, Cell, 2004, 118, 591-605.
78. Cureton, D. K., Harbison, C. E., Cocucci, E., Parrish, C. R. and Kirchhausen, T., *Limited transferrin receptor clustering allows rapid diffusion of canine parvovirus into clathrin endocytic structures*, J. Virol., 2012, 86, 5330-5340.
79. Roth, T. F. and Porter, K. R., *Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L*, J. Cell Biol., 1964, 20, 313-332.
80. Merrifield, C. J., Perrais, D. and Zenisek, D., *Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells*, Cell, 2005, 121, 593-606.
81. Massol, R. H., Boll, W., Griffin, A. M. and Kirchhausen, T., *A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2006, 103, 10265-10270.
82. Rothman, J. E. and Schmid, S. L., *Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles*, Cell, 1986, 46, 5-9.
83. Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E. M. and Sousa, R., *Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone*, Mol. Cell, 2005, 20, 513-524.
84. Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L. and Almers, W., *Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits*, Nat. Cell Biol., 2002, 4, 691-698.
85. Yarar, D., Waterman-Storer, C. M. and Schmid, S. L., *A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis*, Mol. Biol. Cell, 2005, 16, 964-975.
86. Parton, R. G. and Simons, K., *The multiple faces of caveolae*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007, 8, 185-194.
87. Lisanti, M. P., Tang, Z., Scherer, P. E., Kubler, E., Koleske, A. J. and Sargiacomo, M., *Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation*, Mol. Membr. Biol., 1995, 12, 121-124.
88. Kurzchalia, T. V. and Parton, R. G., *Membrane microdomains and caveolae*, Curr. Opin. Cell Biol., 1999, 11, 424-431.
89. Williams, T. M. and Lisanti, M. P., *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2005, 288, C494-506.
90. Pelkmans, L. and Zerial, M., *Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae*, Nature, 2005, 436, 128-133.
91. Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. and Lisanti, M. P., *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*, J. Biol. Chem., 1996, 271, 2255-2261.
92. Way, M. and Parton, R. G., *M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein*, FEBS Lett., 1995, 376, 108-112.
93. Dietzen, D. J., Hastings, W. R. and Lublin, D. M., *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 6838-6842.

-
94. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. and Simons, K., *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1995, 92, 10339-10343.
 95. Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kamen, B. A. and Anderson, R. G., *Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate*, J. Cell Biol., 1990, 111, 2931-2938.
 96. Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G., *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*, Cell, 1992, 68, 673-682.
 97. Ortegren, U., Karlsson, M., Blazic, N., Blomqvist, M., Nystrom, F. H., Gustavsson, J., Fredman, P. and Stralfors, P., *Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes*, Eur. J. Biochem., 2004, 271, 2028-2036.
 98. Krajewska, W. M. and Maslowska, I., *Caveolins: structure and function in signal transduction*, Cell. Mol. Biol. Lett., 2004, 9, 195-220.
 99. Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J. E. and Davies, P. F., *Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro*, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2003, 285, H1720-1729.
 100. Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M. and Jo, H., *Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells*, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2003, 285, H1113-1122.
 101. Radel, C. and Rizzo, V., *Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization*, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2005, 288, H936-945.
 102. Swanson, J. A. and Watts, C., *Macropinocytosis*, Trends Cell Biol., 1995, 5, 424-428.
 103. Racoosin, E. L. and Swanson, J. A., *Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages*, J. Exp. Med., 1989, 170, 1635-1648.
 104. Bar-Sagi, D. and Feramisco, J. R., *Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins*, Science, 1986, 233, 1061-1068.
 105. Ghigo, E., *A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells?*, Intervirology, 2010, 53, 274-283.
 106. Pelkmans, L. and Helenius, A., *Insider information: what viruses tell us about endocytosis*, Curr. Opin. Cell Biol., 2003, 15, 414-422.
 107. Kerr, M. C. and Teasdale, R. D., *Defining macropinocytosis*, Traffic, 2009, 10, 364-371.
 108. Berthiaume, E. P., Medina, C. and Swanson, J. A., *Molecular size-fractionation during endocytosis in macrophages*, J. Cell Biol., 1995, 129, 989-998.
 109. Hewlett, L. J., Prescott, A. R. and Watts, C., *The Coated Pit and Macropinocytic Pathways Serve Distinct Endosome Populations*, J. Cell Biol., 1994, 124, 689-703.
 110. Sieczkarski, S. B. and Whittaker, G. R., *Dissecting virus entry via endocytosis*, J. Gen. Virol., 2002, 83, 1535-1545.
 111. Hooshmand-Rad, R., Claesson-Welsh, L., Wennstrom, S., Yokote, K., Siegbahn, A. and Heldin, C. H., *Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis*, Exp. Cell Res., 1997, 234, 434-441.
 112. West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J. and Watts, C., *Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation*, Curr. Biol., 2000, 10, 839-848.

-
113. Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Cooper, J. A. and Stahl, P. D., *Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during Ras signal transduction*, J. Biol. Chem., 1997, 272, 10337-10340.
 114. Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T. and Endo, T., *Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation*, J. Biol. Chem., 2003, 278, 4063-4071.
 115. Grimmer, S., van Deurs, B. and Sandvig, K., *Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol*, J. Cell Sci., 2002, 115, 2953-2962.
 116. Ballav, C. and Gough, S., *Bydureon: long-acting exenatide for once-weekly injection*, Prescriber, 2012, 23, 30-33.
 117. DeYoung, M. B., MacConell, L., Sarin, V., Trautmann, M. and Herbert, P., *Encapsulation of exenatide in poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres produced an investigational long-acting once-weekly formulation for type 2 diabetes*, Diabetes Technol. Ther., 2011, 13, 1145-1154.
 118. Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M. and Rajotte, R. V., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*, N. Engl. J. Med., 2000, 343, 230-238.
 119. Faraji, A. H. and Wipf, P., *Nanoparticles in cellular drug delivery*, Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 2950-2962.
 120. Panyam, J. and Labhasetwar, V., *Targeting intracellular targets*, Curr. Drug Deliv., 2004, 1, 235-247.
 121. Sunderland, C. J., Steiert, M., Talmadge, J. E., Derfus, A. M. and Barry, S. E., *Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer*, Drug Dev. Res., 2006, 67, 70-93.
 122. Ahmad, Z., Shah, A., Siddiq, M. and Kraatz, H. B., *Polymeric micelles as drug delivery vehicles*, Rsc. Advances., 2014, 4, 17028-17038.
 123. Skirtach, A. G., Karageorgiev, P., Bedard, M. F., Sukhorukov, G. B. and Mohwald, H., *Reversibly permeable nanomembranes of polymeric microcapsules*, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 11572-11573.
 124. Hermanson, K. D., Huemmerich, D., Scheibel, T. and Bausch, A. R., *Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk*, Adv. Mater., 2007, 19, 1810-1815.
 125. Sagis, L. M., Ruiters, R., Miranda, F. J., Ruiters, J., Schroen, K., Aelst, A. C., Kieft, H., Boom, R. and Linden, E., *Polymer microcapsules with a fiber-reinforced nanocomposite shell*, Langmuir, 2008, 24, 1608-1612.
 126. Slotta, U. K., Rammensee, S., Gorb, S. and Scheibel, T., *An engineered spider silk protein forms microspheres*, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 4592-4594.
 127. Chia, S. M., Wan, A. C., Quek, C. H., Mao, H. Q., Xu, X., Shen, L., Ng, M. L., Leong, K. W. and Yu, H., *Multi-layered microcapsules for cell encapsulation*, Biomaterials, 2002, 23, 849-856.
 128. Palankar, R., Skirtach, A. G., Kreft, O., Bedard, M., Garstka, M., Gould, K., Mohwald, H., Sukhorukov, G. B., Winterhalter, M. and Springer, S., *Controlled intracellular release of peptides from microcapsules enhances antigen presentation on MHC class I molecules*, Small, 2009, 5, 2168-2176.
 129. Shchukin, D. G., Sukhorukov, G. B. and Mohwald, H., *Smart inorganic/organic nanocomposite hollow microcapsules*, Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42, 4472-4475.
 130. Xu, J. P., Ji, J., Chen, W. D. and Shen, J. C., *Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery*, J. Control. Release, 2005, 107, 502-512.
 131. Ahmed, F. and Discher, D. E., *Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles*, J. Control. Release, 2004, 96, 37-53.

-
132. Zheng, C., Qiu, L. Y. and Zhu, K. J., *Novel polymersomes based on amphiphilic graft polyphosphazenes and their encapsulation of water-soluble anti-cancer drug*, Polymer, 2009, 50, 1173-1177.
133. Blüm, C., Nichtl, A. and Scheibel, T., *Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes*, Adv. Funct. Mater., 2014, 24, 763-768.
134. Christian, D. A., Cai, S., Bowen, D. M., Kim, Y., Pajerowski, J. D. and Discher, D. E., *Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009, 71, 463-474.
135. Kim, Y., Tewari, M., Pajerowski, J. D., Cai, S., Sen, S., Williams, J. H., Sirsi, S. R., Lutz, G. J. and Discher, D. E., *Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides*, J. Control. Release, 2009, 134, 132-140.
136. Duncan, B., Kim, C. and Rotello, V. M., *Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems*, J. Control. Release, 2010, 148, 122-127.
137. Corma, A., Atienzar, P., Garcia, H. and Chane-Ching, J. Y., *Hierarchically mesostructured doped CeO₂ with potential for solar-cell use*, Nat. Mater., 2004, 3, 394-397.
138. Grosso, D., Boissiere, C., Smarsly, B., Brezesinski, T., Pinna, N., Albouy, P. A., Amenitsch, H., Antonietti, M. and Sanchez, C., *Periodically ordered nanoscale islands and mesoporous films composed of nanocrystalline multimetallic oxides*, Nat. Mater., 2004, 3, 787-792.
139. Mattingly, S. J., O'Toole, M. G., James, K. T., Clark, G. J. and Nantz, M. H., *Magnetic nanoparticle-supported lipid bilayers for drug delivery*, Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 2015, 31, 3326-3332.
140. Ran, Z., Sun, Y., Chang, B., Ren, Q. and Yang, W., *Silica composite nanoparticles containing fluorescent solid core and mesoporous shell with different thickness as drug carrier*, J. Colloid Interface Sci., 2013, 410, 94-101.
141. Liu, Y., Wang, T., He, F., Liu, Q., Zhang, D., Xiang, S., Su, S. and Zhang, J., *An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery*, Int. J. Nanomedicine, 2011, 6, 721-727.
142. Rout, S. R., Behera, B., Maiti, T. K. and Mohapatra, S., *Multifunctional magnetic calcium phosphate nanoparticles for targeted platin delivery*, Dalton Trans., 2012, 41, 10777-10783.
143. Orive, G., Anitua, E., Pedraz, J. L. and Emerich, D. F., *Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration*, Nat. Rev. Neurosci., 2009, 10, 682-692.
144. Luo, G. P., Yu, X. J., Jin, C., Yang, F., Fu, D. L., Long, J., Xu, J., Zhan, C. Y. and Lu, W. Y., *LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors*, Int. J. Pharm., 2010, 385, 150-156.
145. Gros, E., Deshayes, S., Morris, M. C., Aldrian-Herrada, G., Depollier, J., Heitz, F. and Divita, G., *A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction*, Biochim. Biophys. Acta, 2006, 1758, 384-393.
146. Gupta, B., Levchenko, T. S. and Torchilin, V. P., *Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides*, Adv. Drug Delivery Rev., 2005, 57, 637-651.
147. Dietz, G. P. and Bahr, M., *Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach*, Mol. Cell. Neurosci., 2004, 27, 85-131.
148. Mae, M. and Langel, U., *Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery*, Curr. Opin. Pharmacol., 2006, 6, 509-514.
149. Lehto, T., Kurrikoff, K. and Langel, U., *Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids*, Expert Opin. Drug Deliv., 2012, 9, 823-836.
150. Jarver, P., Langel, K., El-Andaloussi, S. and Langel, U., *Applications of cell-penetrating peptides in regulation of gene expression*, Biochem. Soc. Trans., 2007, 35, 770-774.

-
151. Meade, B. R. and Dowdy, S. F., *Enhancing the cellular uptake of siRNA duplexes following noncovalent packaging with protein transduction domain peptides*, Adv. Drug Delivery Rev., 2008, 60, 530-536.
 152. Green, M. and Loewenstein, P. M., *Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein*, Cell, 1988, 55, 1179-1188.
 153. Frankel, A. D. and Pabo, C. O., *Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus*, Cell, 1988, 55, 1189-1193.
 154. Green, M., Ishino, M. and Loewenstein, P. M., *Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression*, Cell, 1989, 58, 215-223.
 155. Vives, E., Schmidt, J. and Pelegrin, A., *Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery*, Biochim. Biophys. Acta, 2008, 1786, 126-138.
 156. Milletti, F., *Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape*, Drug Discov. Today, 2012, 17, 850-860.
 157. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. and Rothbard, J. B., *Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers*, J. Pept. Res., 2000, 56, 318-325.
 158. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K. and Sugiura, Y., *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery*, J. Biol. Chem., 2001, 276, 5836-5840.
 159. Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H. and Futaki, S., *Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo*, J. Control. Release, 2012, 159, 181-188.
 160. Yigit, S., Tokareva, O., Varone, A., Georgakoudi, I. and Kaplan, D. L., *Bioengineered silk gene delivery system for nuclear targeting*, Macromol. Biosci., 2014, 14, 1291-1298.
 161. Kim, B. K., Kang, H., Doh, K. O., Lee, S. H., Park, J. W., Lee, S. J. and Lee, T. J., *Homodimeric SV40 NLS peptide formed by disulfide bond as enhancer for gene delivery*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2012, 22, 5415-5418.
 162. Deshayes, S., Plenat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimellec, C. and Heitz, F., *Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes*, Biochemistry, 2004, 43, 7698-7706.
 163. Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q. N., McMaster, G. K., Brasseur, R., Heitz, F. and Divita, G., *A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells*, Mol. Ther., 2009, 17, 95-103.
 164. Pujals, S. and Giralt, E., *Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides*, Adv. Drug Delivery Rev., 2008, 60, 473-484.
 165. Fernandez-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S. and Giralt, E., *Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein*, Angew. Chem., 2004, 43, 1811-1814.
 166. Schafmeister, C. E., Po, J. and Verdine, G. L., *An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides*, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 5891-5892.
 167. Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S. and Kuliopulos, A., *Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99, 643-648.
 168. Yang, H., Liu, S., Cai, H., Wan, L., Li, S., Li, Y., Cheng, J. and Lu, X., *Chondroitin sulfate as a molecular portal that preferentially mediates the apoptotic killing of tumor*

- cells by penetratin-directed mitochondria-disrupting peptides*, J. Biol. Chem., 2010, 285, 25666-25676.
169. Letoha, T., Keller-Pinter, A., Kusz, E., Kolozsi, C., Bozso, Z., Toth, G., Vizler, C., Olah, Z. and Szilak, L., *Cell-penetrating peptide exploited syndecans*, Biochim. Biophys. Acta, 2010, 1798, 2258-2265.
170. Poon, G. M. and Gariepy, J., *Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells*, Biochem. Soc. Trans., 2007, 35, 788-793.
171. Persson, D., Thoren, P. E. and Norden, B., *Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles*, FEBS Lett., 2001, 505, 307-312.
172. Tiriveedhi, V. and Butko, P., *A fluorescence spectroscopy study on the interactions of the TAT-PTD peptide with model lipid membranes*, Biochemistry, 2007, 46, 3888-3895.
173. Jones, A. T. and Sayers, E. J., *Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs*, J. Control. Release, 2012, 161, 582-591.
174. Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S. and Graslund, A., *Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides*, J. Biophys., 2011, 2011, 414729.
175. Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R. and Boissguerin, P., *Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines*, Bioconjug. Chem., 2008, 19, 2363-2374.
176. Nakase, I., Hirose, H., Tanaka, G., Tadokoro, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T. and Futaki, S., *Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macropinocytosis*, Mol. Ther., 2009, 17, 1868-1876.
177. Tünnemann, G., Martin, R. M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F. and Cardoso, M. C., *Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells*, FASEB J., 2006, 20, 1775-1784.
178. Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura, Y. and Futaki, S., *Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement*, Mol. Ther., 2004, 10, 1011-1022.
179. Guterstam, P., Madani, F., Hirose, H., Takeuchi, T., Futaki, S., El Andaloussi, S., Graslund, A. and Langel, U., *Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate*, Biochim. Biophys. Acta, 2009, 1788, 2509-2517.
180. Kawamura, K. S., Sung, M., Bolewska-Pedyczak, E. and Gariepy, J., *Probing the impact of valency on the routing of arginine-rich peptides into eukaryotic cells*, Biochemistry, 2006, 45, 1116-1127.
181. Ter-Avetisyan, G., Tuennemann, G., Nowak, D., Nitschke, M., Herrmann, A., Drab, M. and Cardoso, M. C., *Cell Entry of Arginine-rich Peptides Is Independent of Endocytosis*, J. Biol. Chem., 2009, 284, 3370-3378.
182. Copolovici, D. M., Langel, K., Eriste, E. and Langel, U., *Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications*, ACS Nano, 2014, 8, 1972-1994.
183. Schmidt, N., Mishra, A., Lai, G. H. and Wong, G. C., *Arginine-rich cell-penetrating peptides*, FEBS Lett., 2010, 584, 1806-1813.
184. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A., *Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent*, J. Biol. Chem., 1996, 271, 18188-18193.
185. Balayssac, S., Burlina, F., Convert, O., Bolbach, G., Chassaing, G. and Lequin, O., *Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency*, Biochemistry, 2006, 45, 1408-1420.
186. De Coupade, C., Fittipaldi, A., Chagnas, V., Michel, M., Carlier, S., Tasciotti, E., Darmon, A., Ravel, D., Kearsey, J., Giacca, M. and Cailler, F., *Novel human-derived*

- cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules*, Biochem. J., 2005, 390, 407-418.
187. Jiang, T. Y., Zhang, Z. H., Zhang, Y. L., Lv, H. X., Zhou, J. P., Li, C. C., Hou, L. L. and Zhang, Q., *Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery*, Biomaterials, 2012, 33, 9246-9258.
188. Bartlett, R. L., 2nd and Panitch, A., *Thermosensitive nanoparticles with pH-triggered degradation and release of anti-inflammatory cell-penetrating peptides*, Biomacromolecules, 2012, 13, 2578-2584.
189. Abes, R., Moulton, H. M., Clair, P., Yang, S. T., Abes, S., Melikov, K., Prevot, P., Youngblood, D. S., Iversen, P. L., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B., *Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: structure-activity studies*, Nucleic Acids Res., 2008, 36, 6343-6354.
190. Reynolds, F., Weissleder, R. and Josephson, L., *Protamine as an efficient membrane-translocating peptide*, Bioconjug. Chem., 2005, 16, 1240-1245.
191. Tian, H., Lin, L., Chen, J., Chen, X., Park, T. G. and Maruyama, A., *RGD targeting hyaluronic acid coating system for PEI-PBLG polycation gene carriers*, J. Control. Release, 2011, 155, 47-53.
192. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. and Langel, U., *VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions*, Exp. Cell Res., 2001, 269, 237-244.
193. Magzoub, M., Sandgren, S., Lundberg, P., Oglecka, K., Lilja, J., Wittrup, A., Goran Eriksson, L. E., Langel, U., Belting, M. and Graslund, A., *N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 348, 379-385.
194. Martin, I., Teixido, M. and Giralt, E., *Design, synthesis and characterization of a new anionic cell-penetrating peptide: SAP(E)*, ChemBioChem, 2011, 12, 896-903.
195. Morris, M. C., Deshayes, S., Heitz, F. and Divita, G., *Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics*, Biol. Cell, 2008, 100, 201-217.
196. Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. and Divita, G., *A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells*, Nucleic Acids Res., 1997, 25, 2730-2736.
197. Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J. L., Dimitrova, Y. and Tam, J. P., *Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7*, Biochemistry, 2002, 41, 14150-14157.
198. Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R. and Scocchi, M., *Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide*, Biochim. Biophys. Acta, 2006, 1760, 1732-1740.
199. Duchardt, F., Ruttekolk, I. R., Verdurmen, W. P., Lortat-Jacob, H., Burck, J., Hufnagel, H., Fischer, R., van den Heuvel, M., Lowik, D. W., Vuister, G. W., Ulrich, A., de Waard, M. and Brock, R., *A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency*, J. Biol. Chem., 2009, 284, 36099-36108.
200. Johansson, H. J., El-Andaloussi, S., Holm, T., Mae, M., Janes, J., Maimets, T. and Langel, U., *Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein*, Mol. Ther., 2008, 16, 115-123.
201. Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M. and Bienert, M., *Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*, Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1414, 127-139.
202. Gomez, J. A., Gama, V., Yoshida, T., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D. and Matsuyama, S., *Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides*, Biochem. Soc. Trans., 2007, 35, 797-801.

-
203. Gomez, J. A., Chen, J., Ngo, J., Hajkova, D., Yeh, I. J., Gama, V., Miyagi, M. and Matsuyama, S., *Cell-Penetrating Penta-Peptides (CPP5s): Measurement of Cell Entry and Protein-Transduction Activity*, Pharmaceuticals, 2010, 3, 3594-3613.
204. Nakayama, F., Yasuda, T., Umeda, S., Asada, M., Imamura, T., Meineke, V. and Akashi, M., *Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12*, J. Biol. Chem., 2011, 286, 25823-25834.
205. Watkins, C. L., Brennan, P., Fegan, C., Takayama, K., Nakase, I., Futaki, S. and Jones, A. T., *Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD*, J. Control. Release, 2009, 140, 237-244.
206. Gao, S., Simon, M. J., Hue, C. D., Morrison, B., 3rd and Banta, S., *An unusual cell penetrating peptide identified using a plasmid display-based functional selection platform*, ACS Chem. Biol., 2011, 6, 484-491.
207. Gao, C., Mao, S., Ditzel, H. J., Farnaes, L., Wirsching, P., Lerner, R. A. and Janda, K. D., *A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library*, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 4057-4065.
208. Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J. and Kaplan, D. L., *Silk-based biomaterials*, Biomaterials, 2003, 24, 401-416.
209. Chen, J., Glaus, C., Laforest, R., Zhang, Q., Yang, M., Gidding, M., Welch, M. J. and Xia, Y., *Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment*, Small, 2010, 6, 811-817.
210. Dreaden, E. C., Mwakwari, S. C., Sodji, Q. H., Oyelere, A. K. and El-Sayed, M. A., *Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment*, Bioconjug. Chem., 2009, 20, 2247-2253.
211. Wang, Y. X., *Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application*, Quantitative Imaging Med. Surg., 2011, 1, 35-40.
212. Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E. and Lye, S., *Nanomedicine : Magnetic nanoparticles for drug delivery and hyperthermia - new chances for cancer therapy*, Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 2010, 53, 839-845.
213. Zhu, J., Liao, L., Zhu, L., Zhang, P., Guo, K., Kong, J., Ji, C. and Liu, B., *Size-dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells*, Talanta, 2013, 107, 408-415.
214. Chen, Y. P., Chen, C. T., Hung, Y., Chou, C. M., Liu, T. P., Liang, M. R., Chen, C. T. and Mou, C. Y., *A New Strategy for Intracellular Delivery of Enzyme Using Mesoporous Silica Nanoparticles: Superoxide Dismutase*, J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 1516-1523.
215. Grund, S., Bauer, M. and Fischer, D., *Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends*, Adv. Eng. Mater., 2011, 13, B61-B87.
216. Lück, M., Pistel, K. F., Li, Y. X., Blunk, T., Muller, R. H. and Kissel, T., *Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition*, J. Control. Release, 1998, 55, 107-120.
217. Berklund, C., Kim, K. and Pack, D. W., *Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions*, J. Control. Release, 2001, 73, 59-74.

-
218. Herrmann, J. and Bodmeier, R., *The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a w/o/w solvent evaporation method*, J. Control. Release, 1995, 36, 63-71.
219. Freiberg, S. and Zhu, X. X., *Polymer microspheres for controlled drug release*, Int. J. Pharm., 2004, 282, 1-18.
220. Choy, Y. B., Cheng, F., Choi, H. and Kim, K. K., *Monodisperse gelatin microspheres as a drug delivery vehicle: release profile and effect of crosslinking density*, Macromol. Biosci., 2008, 8, 758-765.
221. Wenk, E., Wandrey, A. J., Merkle, H. P. and Meinel, L., *Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery*, J. Control. Release, 2008, 132, 26-34.
222. Hofmann, S., Wong Po Foo, C. T., Rosetti, F., Textor, M., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L., Merkle, H. P. and Meinel, L., *Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery*, J. Control. Release, 2006, 111, 219-227.
223. George, M. and Abraham, T. E., *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review*, J. Control. Release, 2006, 114, 1-14.
224. Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. and Alonso, M. J., *Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines*, Pharm. Res., 1997, 14, 1431-1436.
225. Megeed, Z., Cappello, J. and Ghandehari, H., *Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery*, Adv. Drug Delivery Rev., 2002, 54, 1075-1091.
226. Digenis, G. A., Gold, T. B. and Shah, V. P., *Cross-Linking of Gelatin Capsules and Its Relevance to Their in-Vitro in-Vivo Performance*, J. Pharm. Sci., 1994, 83, 915-921.
227. Speer, D. P., Chvapil, M., Eskelson, C. D. and Ulreich, J., *Biological Effects of Residual Glutaraldehyde in Glutaraldehyde-Tanned Collagen Biomaterials*, J. Biomed. Mater. Res., 1980, 14, 753-764.
228. Craig, C. L., *Evolution of arthropod silks*, Annu. Rev. Entomol., 1997, 42, 231-267.
229. Lintz, E. S. and Scheibel, T. R., *Dragline, Egg Stalk and Byssus: A Comparison of Outstanding Protein Fibers and Their Potential for Developing New Materials*, Adv. Funct. Mater., 2013, 23, 4467-4482.
230. Sutherland, T. D., Weisman, S., Walker, A. A. and Mudie, S. T., *Invited review the coiled coil silk of bees, ants, and hornets*, Biopolymers, 2012, 97, 446-454.
231. Weisman, S., Okada, S., Mudie, S. T., Huson, M. G., Trueman, H. E., Sriskantha, A., Haritos, V. S. and Sutherland, T. D., *Fifty years later: the sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk*, J. Struct. Biol., 2009, 168, 467-475.
232. World Spider Catalog (2015). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 16, accessed on 06/02/2015.
233. Humenik, M., Scheibel, T. and Smith, A., *Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber*, Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 2011, 103, 131-185.
234. Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H. and Gosline, J. M., *Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family*, Science, 1996, 272, 112-115.
235. Aprhisiart, A. and Vollrath, F., *Design-Features of the Orb Web of the Spider, Araneus-Diadematus*, Behav. Ecol., 1994, 5, 280-287.
236. Gosline, J. M., Pollak, C. C., Guerette, P. A., Cheng, A., Demont, M. E. and Denny, M. W., *Elastomeric Network Models for the Frame and Viscid Silks from the Orb Web of the Spider Araneus-Diadematus*, Silk Polymers, 1994, 544, 328-341.
237. Vollrath, F. and Porter, D., *Spider silk as archetypal protein elastomer*, Soft Matter, 2006, 2, 377-385.

-
238. Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. and Savage, K. N., *The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function*, J. Exp. Biol., 1999, 202, 3295-3303.
239. Scheibel, T., *Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins*, Microb. Cell Fact., 2004, 3, 14.
240. Brooks, A. E., Steinkraus, H. B., Nelson, S. R. and Lewis, R. V., *An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from Nephila clavipes and Argiope aurantia*, Biomacromolecules, 2005, 6, 3095-3099.
241. Tillinghast, E. K. and Townley, M. A., *Silk Glands of Araneid Spiders - Selected Morphological and Physiological-Aspects*, Silk Polymers, 1994, 544, 29-44.
242. Riekel, C. and Vollrath, F., *Spider silk fibre extrusion: combined wide- and small-angle X-ray microdiffraction experiments*, Int. J. Biol. Macromol., 2001, 29, 203-210.
243. Dicko, C., Knight, D., Kenney, J. M. and Vollrath, F., *Secondary structures and conformational changes in flagelliform, cylindrical, major, and minor ampullate silk proteins. Temperature and concentration effects*, Biomacromolecules, 2004, 5, 2105-2115.
244. Hajer, J. and Rehakova, D., *Spinning activity of the spider Trogloneta granulum (Araneae, Mysmenidae): web, cocoon, cocoon handling behaviour, draglines and attachment discs*, Zoology, 2003, 106, 223-231.
245. Heidebrecht, A. and Scheibel, T., *Recombinant production of spider silk proteins*, Adv. Appl. Microbiol., 2013, 82, 115-153.
246. Blackledge, T. A. and Hayashi, C. Y., *Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider Argiope argentata (Fabricius 1775)*, J. Exp. Biol., 2006, 209, 2452-2461.
247. Huang, W., Lin, Z., Sin, Y. M., Li, D., Gong, Z. and Yang, D., *Characterization and expression of a cDNA encoding a tubuliform silk protein of the golden web spider Nephila antipodiana*, Biochimie, 2006, 88, 849-858.
248. La Mattina, C., Reza, R., Hu, X., Falick, A. M., Vasanthavada, K., McNary, S., Yee, R. and Vierra, C. A., *Spider minor ampullate silk proteins are constituents of prey wrapping silk in the cob weaver Latrodectus hesperus*, Biochemistry, 2008, 47, 4692-4700.
249. Nova, A., Keten, S., Pugno, N. M., Redaelli, A. and Buehler, M. J., *Molecular and nanostructural mechanisms of deformation, strength and toughness of spider silk fibrils*, Nano Lett., 2010, 10, 2626-2634.
250. Frische, S., Maunsbach, A. B. and Vollrath, F., *Elongate cavities and skin-core structure in Nephila spider silk observed by electron microscopy*, J. Microsc., 1998, 189, 64-70.
251. Augsten, K., Muhlig, P. and Herrmann, C., *Glycoproteins and skin-core structure in Nephila clavipes spider silk observed by light and electron microscopy*, Scanning, 2000, 22, 12-15.
252. Smith, A. and Scheibel, T., *Hierarchical Protein Assemblies as a Basis for Materials, Materials Design Inspired by Nature: Function through Inner Architecture*, 2013, 256-281.
253. van Beek, J. D., Hess, S., Vollrath, F. and Meier, B. H., *The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99, 10266-10271.
254. Papadopoulos, P., Solter, J. and Kremer, F., *Hierarchies in the structural organization of spider silk-a quantitative model*, Colloid Polym. Sci., 2009, 287, 231-236.
255. Kummerlen, J., van Beek, J. D., Vollrath, F. and Meier, B. H., *Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance*, Macromolecules, 1996, 29, 2920-2928.

-
256. Simmons, A. H., Michal, C. A. and Jelinski, L. W., *Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk*, Science, 1996, 271, 84-87.
257. Riekel, C., Muller, M. and Vollrath, F., *In situ X-ray diffraction during forced silking of spider silk*, Macromolecules, 1999, 32, 4464-4466.
258. Grubb, D. T. and Jelinski, L. W., *Fiber morphology of spider silk: The effects of tensile deformation*, Macromolecules, 1997, 30, 2860-2867.
259. Xu, M. and Lewis, R. V., *Structure of a Protein Superfiber - Spider Dragline Silk*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1990, 87, 7120-7124.
260. Hinman, M. B. and Lewis, R. V., *Isolation of a Clone Encoding a 2nd Dragline Silk Fibroin - Nephila-Clavipes Dragline Silk Is a 2-Protein Fiber*, J. Biol. Chem., 1992, 267, 19320-19324.
261. Rising, A., Hjalm, G., Engstrom, W. and Johansson, J., *N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriciform spider silk proteins*, Biomacromolecules, 2006, 7, 3120-3124.
262. Rising, A., Nimmervoll, H., Grip, S., Fernandez-Arias, A., Storckenfeldt, E., Knight, D. P., Vollrath, F. and Engstrom, W., *Spider silk proteins - Mechanical property and gene sequence*, Zoological Science, 2005, 22, 273-281.
263. Ayoub, N. A., Garb, J. E., Tinghitella, R. M., Collin, M. A. and Hayashi, C. Y., *Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes*, PLoS One, 2007, 2.
264. Hayashi, C. Y., Blackledge, T. A. and Lewis, R. V., *Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family*, Mol. Biol. Evol., 2004, 21, 1950-1959.
265. Winkler, S. and Kaplan, D. L., *Molecular biology of spider silk*, J. Biotechnol., 2000, 74, 85-93.
266. Thiel, B. L. and Viney, C., *Beta sheets and spider silk*, Science, 1996, 273, 1480-1481.
267. Hagn, F., Eisoldt, L., Hardy, J. G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T. and Kessler, H., *A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly*, Nature, 2010, 465, 239-242.
268. Eisoldt, L., Thamm, C. and Scheibel, T., *Review the role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins*, Biopolymers, 2012, 97, 355-361.
269. Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V., *Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins*, Biomacromolecules, 2005, 6, 3152-3159.
270. Askarieh, G., Hedhammar, M., Nordling, K., Saenz, A., Casals, C., Rising, A., Johansson, J. and Knight, S. D., *Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay*, Nature, 2010, 465, 236-238.
271. Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. and Lewis, R., *Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences*, Science, 2001, 291, 2603-2605.
272. Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U. and Ittah, S., *Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins*, Curr. Biol., 2004, 14, 2070-2074.
273. Fox, L. R., *Cannibalism in Natural-Populations*, Annu. Rev. Ecol. Syst., 1975, 6, 87-106.
274. Madsen, B., Shao, Z. Z. and Vollrath, F., *Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual*, Int. J. Biol. Macromol., 1999, 24, 301-306.

-
275. Craig, C. L., Riekel, C., Herberstein, M. E., Weber, R. S., Kaplan, D. and Pierce, N. E., *Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders*, Mol. Biol. Evol., 2000, 17, 1904-1913.
276. Arcidiacono, S., Mello, C. M., Butler, M., Welsh, E., Soares, J. W., Allen, A., Ziegler, D., Laue, T. and Chase, S., *Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silks*, Macromolecules, 2002, 35, 1262-1266.
277. Menassa, R., Zhu, H., Karatzas, C. N., Lazaris, A., Richman, A. and Brandle, J., *Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production*, Plant Biotechnol. J., 2004, 2, 431-438.
278. Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J. F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W. and Karatzas, C. N., *Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells*, Science, 2002, 295, 472-476.
279. Vendrely, C. and Scheibel, T., *Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications*, Macromol. Biosci., 2007, 7, 401-409.
280. Humenik, M., Smith, A. M. and Scheibel, T., *Recombinant Spider Silks-Biopolymers with Potential for Future Applications*, Polymers, 2011, 3, 640-661.
281. Humenik, M., Magdeburg, M. and Scheibel, T., *Influence of repeat numbers on self-assembly rates of repetitive recombinant spider silk proteins*, J. Struct. Biol., 2014, 186, 431-437.
282. Wohlrab, S., Muller, S., Schmidt, A., Neubauer, S., Kessler, H., Leal-Egana, A. and Scheibel, T., *Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins*, Biomaterials, 2012, 33, 6650-6659.
283. Elsner, M. B., Herold, H. M., Muller-Herrmann, S., Bargel, H. and Scheibel, T., *Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles*, Biomater. Sci., 2015, 3, 543-551.
284. Doblhofer, E. and Scheibel, T., *Engineering of recombinant spider silk proteins allows defined uptake and release of substances*, J. Pharm. Sci., 2015, 104, 988-994.
285. Hardy, J. G., Romer, L. M. and Scheibel, T. R., *Polymeric materials based on silk proteins*, Polymer, 2008, 49, 4309-4327.
286. Heidebrecht, A., Eisoldt, L., Diehl, J., Schmidt, A., Geffers, M., Lang, G. and Scheibel, T., *Biomimetic fibers made of recombinant spidroins with the same toughness as natural spider silk*, Adv. Mater., 2015, 27, 2189-2194.
287. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*, Composites Science and Technology, 2003, 63, 2223-2253.
288. Wohlrab, S., Thamm, C. and Scheibel, T., *The Power of Recombinant Spider Silk Proteins*, Biotechnology of Silk, 2014, 5, 179-201.
289. Leal-Egana, A., Lang, G., Maurer, C., Wickinghoff, J., Weber, M., Geimer, S. and Scheibel, T., *Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein*, Adv. Eng. Mater., 2012, 14, B67-B75.
290. Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P. and Scheibel, T., *Structural analysis of spider silk films*, Supramol. Chem., 2006, 18, 465-471.
291. Metwalli, E., Slotta, U., Darko, C., Roth, S. V., Scheibel, T. and Papadakis, C. M., *Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post-treatment*, Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process., 2007, 89, 655-661.
292. Spiess, K., Wohlrab, S. and Scheibel, T., *Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films*, Soft Matter, 2010, 6, 4168-4174.
293. Jiang, C. Y., Wang, X. Y., Gunawidjaja, R., Lin, Y. H., Gupta, M. K., Kaplan, D. L., Naik, R. R. and Tsukruk, V. V., *Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films*, Adv. Funct. Mater., 2007, 17, 2229-2237.

-
294. Wang, X. Y., Hu, X., Daley, A., Rabotyagova, O., Cebe, P. and Kaplan, D. L., *Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release*, J. Control. Release, 2007, 121, 190-199.
295. Pritchard, E. M., Valentin, T., Boison, D. and Kaplan, D. L., *Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release*, Biomaterials, 2011, 32, 909-918.
296. Zeplin, P. H., Berninger, A. K., Maksimovikj, N. C., van Gelder, P., Scheibel, T. and Walles, H., *Improving the Biocompatibility of Silicone Implants Using Spider Silk Coatings: Immunohistochemical Analysis of Capsule Formation*, Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie, 2014, 46, 336-341.
297. Zeplin, P. H., Maksimovikj, N. C., Jordan, M. C., Nickel, J., Lang, G., Leimer, A. H., Roemer, L. and Scheibel, T., *Spider Silk Coatings as a Bioshield to Reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation*, Adv. Funct. Mater., 2014, 24, 2658-2666.
298. Hermanson, K. D., Harasim, M. B., Scheibel, T. and Bausch, A. R., *Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein*, Phys. Chem. Chem. Phys., 2007, 9, 6442-6446.
299. Eisoldt, L., Smith, A. and Scheibel, T., *Decoding the secrets of spider silk*, Materials Today, 2011, 14, 80-86.
300. Rammensee, S., Huemmerich, D., Hermanson, K. D., Scheibel, T. and Bausch, A. R., *Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk*, Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process., 2006, 82, 261-264.
301. Slotta, U., Hess, S., Spiess, K., Stromer, T., Serpell, L. and Scheibel, T., *Spider silk and amyloid fibrils: A structural comparison*, Macromol. Biosci., 2007, 7, 183-188.
302. Humenik, M. and Scheibel, T., *Nanomaterial Building Blocks Based on Spider Silk-Oligonucleotide Conjugates*, ACS Nano, 2014, 8, 1342-1349.
303. Branco, M. C. and Schneider, J. P., *Self-assembling materials for therapeutic delivery*, Acta Biomater., 2009, 5, 817-831.
304. Schacht, K. and Scheibel, T., *Controlled Hydrogel Formation of a Recombinant Spider Silk Protein*, Biomacromolecules, 2011, 12, 2488-2495.
305. Schacht, K., Jungst, T., Schweinlin, M., Ewald, A., Groll, J. and Scheibel, T., *Biofabrication of Cell-Loaded 3D Spider Silk Constructs*, Angew. Chem. Int. Ed., 2015, 54, 2816-2820.
306. Lammel, A., Schwab, M., Slotta, U., Winter, G. and Scheibel, T., *Processing conditions for the formation of spider silk microspheres*, ChemSusChem, 2008, 1, 413-416.
307. Helfricht, N., Klug, M., Mark, A., Kuznetsov, V., Blum, C., Scheibel, T. and Papastavrou, G., *Surface properties of spider silk particles in solution*, Biomater. Sci., 2013, 1, 1166-1171.
308. Neubauer, M. P., Blum, C., Agostini, E., Engert, J., Scheibel, T. and Fery, A., *Micromechanical characterization of spider silk particles*, Biomater. Sci., 2013, 1, 1160-1165.
309. Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G. and Scheibel, T., *Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles*, Biomaterials, 2011, 32, 2233-2240.
310. Hofer, M., Winter, G. and Myschik, J., *Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs*, Biomaterials, 2012, 33, 1554-1562.
311. Blüm, C. and Scheibel, T., *Control of drug loading and release properties of spider silk sub-microparticles*, BioNanoScience, 2012, 2, 67-74.
312. Liebmann, B., Huemmerich, D., Scheibel, T. and Fehr, M., *Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein*, Colloids Surf., A, 2008, 331, 126-132.
313. Subia, B., Chandra, S., Talukdar, S. and Kundu, S. C., *Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery*, Integr. Biol., 2014, 6, 203-214.

-
314. Subia, B. and Kundu, S. C., *Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers*, Nanotechnology, 2013, 24, 035103.
315. Kulkarni, S. A. and Feng, S. S., *Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery*, Pharm. Res., 2013, 30, 2512-2522.
316. Firdessa, R., Oelschlaeger, T. A. and Moll, H., *Identification of multiple cellular uptake pathways of polystyrene nanoparticles and factors affecting the uptake: Relevance for drug delivery systems*, Eur. J. Cell Biol., 2014, 93, 323-337.
317. He, C. B., Hu, Y. P., Yin, L. C., Tang, C. and Yin, C. H., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*, Biomaterials, 2010, 31, 3657-3666.
318. Win, K. Y. and Feng, S. S., *Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs*, Biomaterials, 2005, 26, 2713-2722.
319. Müller, R. H., *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 1996.
320. Hersel, U., Dahmen, C. and Kessler, H., *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*, Biomaterials, 2003, 24, 4385-4415.
321. Pellinen, T., Tuomi, S., Arjonen, A., Wolf, M., Edgren, H., Meyer, H., Grosse, R., Kitzing, T., Rantala, J. K., Kallioniemi, O., Fassler, R., Kallio, M. and Ivaska, J., *Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis*, Dev. Cell, 2008, 15, 371-385.
322. Shi, F. and Sottile, J., *Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover*, J. Cell Sci., 2008, 121, 2360-2371.
323. Galvez, B. G., Matias-Roman, S., Yanez-Mo, M., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. and Arroyo, A. G., *Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells*, Mol. Biol. Cell, 2004, 15, 678-687.
324. Nishimura, T. and Kaibuchi, K., *Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3*, Dev. Cell, 2007, 13, 15-28.
325. Liu, L., He, B., Liu, W. M., Zhou, D., Cox, J. V. and Zhang, X. A., *Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking*, J. Biol. Chem., 2007, 282, 31631-31642.
326. Caswell, P. T., Vadrevu, S. and Norman, J. C., *Integrins: masters and slaves of endocytic transport*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2009, 10, 843-853.
327. Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J. L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E. and Zoratti, M., *Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of Helicobacter pylori is required for its biological activity*, EMBO J., 1999, 18, 5517-5527.
328. Kleppmann, W., *Versuchsplanung - Produkte und Prozesse optimieren*, Carl Hanser Verlag, München Wien, 7 edn., 2011.
329. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1995, 92, 7297-7301.
330. Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H. P. and Kissel, T., *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*, Pharm. Res., 1999, 16, 1273-1279.

- 331. Tacar, O., Srimornsak, P. and Dass, C. R., *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*, J. Pharm. Pharmacol., 2013, 65, 157-170.
- 332. Leal-Egana, A. and Scheibel, T., *Silk-based materials for biomedical applications*, Biotechnol. Appl. Biochem., 2010, 55, 155-167.

5. Darstellung des Eigenanteils

- I. **Elsner, M. B.**, Herold, H. M., Müller-Herrmann, S., Bargel, H. and Scheibel, T., *Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles*, Biomaterials Science, 2015, 3, 543-551

Das Protein eADF4(C16)_{R8}G wurde von Susanne Müller-Herrmann kloniert. Die Proteine Tat-eADF4(C16), eADF4(C16)Tat und Tat-eADF4(C16)Tat wurden von Heike M. Herold kloniert, hergestellt und gereinigt. Alle anderen Proteine wurden von Andreas Schmidt bzw. Johannes Diehl fermentiert und von mir gereinigt. Die Partikel aus Tat-eADF4(C16), eADF4(C16)Tat und Tat-eADF4(C16)Tat wurden von Heike M. Herold, alle anderen von mir selbst hergestellt. DLS, Zeta-Potential Messung, und kolloidale Stabilitätsanalyse wurde von mir bzw. in Bezug auf Tat-eADF4(C16), eADF4(C16)Tat und Tat-eADF4(C16)Tat von Heike M. Herold und mir in Zusammenarbeit durchgeführt. Die Analyse der Partikel mittels REM sowie die Probenvorbereitung wurde von mir, die Messung der Kritisch-Punkt-getrockneten Proben von Hendrik Bargel ausgeführt. Die Zellkulturexperimente inklusive Zytotoxizitäts-Messung, Analyse der Proliferation, Aufnahmeanalyse mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie sowie die Identifikation des Aufnahmemechanismus wurde von mir selbst durchgeführt. Das Manuskript wurde von mir verfasst. Thomas Scheibel betreute das Projekt und war an wissenschaftlichen Diskussionen sowie an der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

- II. **Schierling, M. B. ***, Doblhofer, E.* and Scheibel, T., *Cellular uptake of drug loaded spider silk particles*, Manuskript eingereicht

eADF4(C16)RGD, eADF4(C16)_{R8}G und eADF4(κ 16) wurden von Andreas Schmidt bzw. Johannes Diehl fermentiert und Elena Doblhofer (eADF4(κ 16)) bzw. mir selbst gereinigt. Die Kopplung von Fluoreszein an ssDNA bzw. PEI wurde von Elena Doblhofer übernommen. Die Herstellung der Partikel sowie die Beladung wurden von Elena Doblhofer für DLS, Zeta-Potential Messungen sowie für die Analyse der kolloidalen Stabilität durchgeführt. Die Herstellung sowie die Beladung der Partikel, welche für alle Zellkulturexperimente verwendet wurden, wurden von mir selbst übernommen. Die Partikelbeschichtung erfolgte durch Elena Doblhofer. DLS, Zeta-Potential-Messungen und Analyse der kolloidalen Stabilität wurden ebenfalls von Elena Doblhofer durchgeführt. Die Herstellung des Doxorubicin-DNA Komplexes, die Beladung der Partikel sowie die Analyse der Freisetzung von Dox aus

DNA/Dox beladenen eADF4(κ 16)-Partikel wurde von mir durchgeführt. Des Weiteren habe ich die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien, Zytotoxizitäts-Analysen, Analyse der Aufnahme mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie sowie die Analyse des Aufnahmemechanismus selbst übernommen. Das Manuskript wurde von mir und Elena Doblhofer in Zusammenarbeit verfasst. Thomas Scheibel betreute das Projekt und war an wissenschaftlichen Diskussionen sowie an der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

III. Borkner, C. B., **Elsner, M. B.**, and Scheibel, T., *Coatings and films made of silk proteins*, ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6, 15611-15625.

Die Konzeption des Artikels wurde von Christian B. Borkner, Thomas Scheibel und mir erarbeitet. Das Manuskript wurde von Christian B. Borkner und mir in Zusammenarbeit verfasst. Thomas Scheibel war in wissenschaftliche Diskussionen und der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

*gleichberechtigte Co-Autorenschaft

6. Publikationsliste

Schierling, M. B. *, Doblhofer, E.* and Scheibel, T., *Cellular uptake of drug loaded spider silk particles*, *Manuskript eingereicht*

Elsner, M. B., Herold, H. M., Müller-Herrmann, S., Bargel, H. and Scheibel, T., *Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles*, *Biomaterials Science*, 2015, 3, 543-551

Borkner, C. B., **Elsner, M. B.**, and Scheibel, T., *Coatings and films made of silk proteins*, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6, 15611-15625

Heim, M., **Elsner, M.B.** and Scheibel, T., *Lipid specific β -sheet formation in a mussel byssus protein domain*, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 3238-3245

*gleichberechtigte Co-Autorenschaft

7. Teilarbeiten

7.1 Teilarbeit I

Die Veröffentlichung der Ergebnisse dieses Kapitels erfolgte in der Zeitschrift *Biomaterials Science* unter:

“Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles”

Elsner, M. B., Herold, H. M., Müller-Herrmann, S., Bargel, H. and Scheibel, T.

Reproduziert aus *Biomaterials Science*, 2015, 3, 543-551 mit freundlicher Genehmigung des Verlages *The Royal Society of Chemistry* 2015.



Cite this: *Biomater. Sci.*, 2015, **3**, 543

Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles†

Martina B. Elsner,^a Heike M. Herold,^a Susanne Müller-Herrmann,^a Hendrik Bargel^a and Thomas Scheibel^{*a,b,c,d,e}

Drug delivery systems allow tissue/cell specific targeting of drugs in order to reduce total drug amounts administered to an organism and potential side effects upon systemic drug delivery. Most drug delivery systems are polymer-based, but the number of possible materials is limited since many commercially available polymers induce allergic or inflammatory responses or lack either biodegradability or the necessary stability *in vivo*. Spider silk proteins represent a new class of (bio)polymers that can be used as drug depots or drug delivery systems. The recombinant spider silk protein eADF4(C16), which can be processed into different morphologies such as particles, films, or hydrogels, has been shown to fulfil most criteria necessary for its use as biomaterial. Further, eADF4(C16) particles have been shown to be well-suited for drug delivery. Here, a new method was established for particle production to reduce particle size and size distribution. Importantly, cellular uptake of these particles was shown to be poor in HeLa cells. Therefore, variants of eADF4(C16) with inversed net charge or incorporated cell penetrating peptides and receptor interacting motifs were tested, showing much better cellular uptake. Interestingly, uptake of all silk variant particles was mainly achieved by clathrin-mediated endocytosis.

Received 20th November 2014,
Accepted 30th December 2014

DOI: 10.1039/c4bm00401a

www.rsc.org/biomaterialsscience

Introduction

In principle drug delivery systems allow the achievement of constant drug levels at targeted locations within the body. Two generally different systems have been developed: depot systems located specifically within the tissue of choice or mobile systems that convey drugs embedded in a carrier to targeted tissues/cells. Hydrogels or films can be used as depots,¹ whereas mostly particulate systems are used as drug delivery devices. Amongst the materials employed as carrier systems are inorganic (nano)particles, lipid vehicles, and most commonly synthetic polymers like poly(lactide), poly(lactic-co-glycolic acid), or poly(glycolic acid) and natural polymers such as gelatin, alginate, chitosan or silk proteins.^{2–7} Polymeric systems are the preferred material because many polymers show good biocompatibility, can be chemically modified

according to the desired application, and are suitable for entrapment of therapeutic agents, allowing controlled release of the encapsulated drug over days or even months.^{8,9} However, synthetic polymers often need organic solvents and harsh formulation conditions for processing. Natural polymers, in contrast, are produced under mild environmental conditions (*i.e.* aqueous buffer systems) and show much higher biocompatibility.¹⁰

Amongst natural polymers, silk proteins constitute a promising new material due to their biocompatibility and biodegradability. Recently, materials made of recombinantly produced spider silk proteins or silkworm fibroin have been shown to be well tolerated by cells.^{11–16} In this respect, particles made of eADF4(C16) have been previously used as drug delivery vehicles. eADF4(C16) is based on the repetitive core domain of the spidroin ADF4 of the European garden spider *Araneus diadematus* and can be processed into different morphologies including films,^{17,18} hydrogels,¹⁹ non-woven mats,²⁰ capsules,^{21,22} and particles.^{23,24} Particles are produced with adjustable particle size by salting out, upon varying either protein concentration or mixing intensity with the salting-out reagent.²⁴ Diameters of particles were in the range of 250 nm to 3 μ m. Generally, cellular uptake of silk particles is rare^{13,25,26} probably due to the size of the particles, lack of binding ligands or the negative net/surface charge of some silk proteins.

Here, we used three approaches to improve cellular uptake of eADF4(C16) particles. Firstly, we established a new

^aLehrstuhl Biomaterialien, Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, Bayreuth D-95447, Germany. E-mail: Thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

^bBayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, Bayreuth D-95447, Germany

^cBayreuther Zentrum für Bio-Makromoleküle (bio-mac), Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, Bayreuth D-95447, Germany

^dBayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, Bayreuth D-95447, Germany

^eBayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, Bayreuth D-95447, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4bm00401a



technique to process spider silk proteins into particles with small diameters by using ionic liquids as a starting solvent. Secondly, silk proteins were functionalized with cell penetrating peptides (CPP) to enhance the cellular uptake of particles. CPPs are short (up to 30 amino acids), mostly cationic peptides, able to cross cellular membranes and, thereby, transport cargo (particles, DNA, RNA, proteins, liposomes) into cells.^{27–33} The transport across membranes occurs *via* energy-dependent and/or independent mechanisms, with the exact mechanism of how the particles cross membranes being largely unresolved. The first discovered CPP was part of the *trans*-activator of transcription (Tat) protein of the HI-Virus in 1989^{34,35} (amino acid sequence GRKKRRQRRPPQ). Nowadays, beyond protein-derived CPPs, designed peptides such as poly-arginines (R_n) are also in use.^{36–47} Furthermore, both Tat- and R₈-peptides possess nuclear targeting properties which can be advantageous in some cases of drug delivery.^{42,48} In this study Tat- and R₈G-peptides as well as RGD⁴⁹ were employed as CPPs to functionalize eADF4(C16). Thirdly, since the net- and surface charge of particles also plays a role in cellular uptake, all glutamic acid residues of polyanionic eADF4-(C16) were mutated to lysine ones, yielding the polycationic eADF4(k16).⁵⁰

Endocytosis plays an important role in various unspecific and specific functions (*e.g.* nutrient uptake, signal transduction, regulation mechanism of cell migration, shape and volume, transcellular transport) of a cell. For the identification of internalization of substances, particles, *etc.* pharmacological inhibitors are commonly used. The choice of an inhibitor for uptake studies is not easy because many are not very specific or cause side effects. Ivanov⁵¹ compared the commonly used inhibitors for different endocytotic pathways. Based on this comparison dansylcadaverine and di-methyl-amiloride are the favourable inhibitors of clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis due to specificity and low side effects. These inhibitors were here used to determine the cellular uptake route of the individual spider silk particles.

Experimental

Genetic modification of eADF4(C16)

eADF4(C16) is based on 16 repeats of the consensus sequence of spidroin ADF4 of the European garden spider (*Araneus diadematus*) (C-module: GSSAAAAAASGPGGY GPENQGPSGPGYGPGGPG), and a T7-tag fused to the aminoterminal for detection purposes.⁵² Fusions were made using tags as described in Wohlrab *et al.*⁴⁹ For each tag, DNA cassettes were created by annealing two synthetic oligonucleotides (R₈-peptide tag: GATCCATGGGCGTCGCCGTCGTCGCCGTCGCCGTGGCTAATGAA and AGCTTTCATTAGCCACGGCGACGGCGACGACGGCGACGGCCCATG; Tat aminoterminal tag: CATGGGCGCGCAAAAACGCCG CAGCGCCGTCGCGGCTAATGAAA and AGCTTTCATTAGCCGCGACGGCGCT GACGGCGTTTTTTTGC GGCC; Tat carboxyterminal tag: CATGGGCGCGCAAAAACGCCGTCAGCGCCGTCGCCCGGGCTAA-

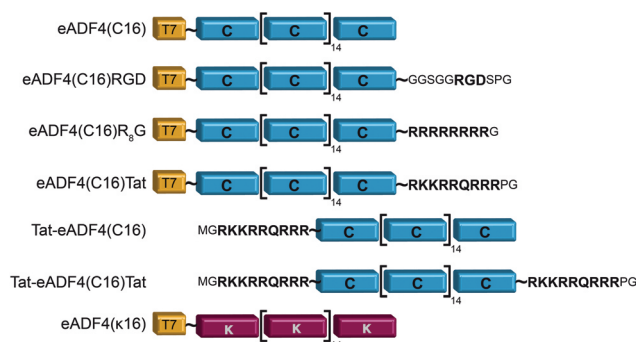


Fig. 1 Schematic design of eADF4 variants used in this study. All constructs were created by genetic engineering.^{49,50}

TGAAA and AGCTTTCAT TAGCCCGGGCGACGGCGCTGACGGCGTTTTTTTGC GGCC). The resulting amino acid sequences and the modified proteins are shown in Fig. 1. DNA sequences of the tags were inserted into the cloning vector *pCS-eADF4(C16)* by seamless cloning as described by Huemerich *et al.*⁵² Successful cloning was confirmed by sequencing.

Production of recombinant spider silk proteins

Recombinant ADF4 derivatives were produced in *E. coli* as described previously.⁵² Proteins were purified after lysis using ultrasonication, centrifugation of the cell debris, heat denaturation of *E. coli* proteins (80 °C, 20 min) and their removal by a second centrifugation step. The soluble spider silk proteins remaining in the supernatant were precipitated using 20% ammonium sulfate at 25 °C and lyophilized. Isoelectric point (pI) and molecular weight (MW) of the recombinant proteins were calculated using ExPASy ProtParam (Table 1). eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, eADF4(C16)R₈G, eADF4(C16)Tat and eADF4(k16) contain an aminoterminal T7-tag, whereas Tat-eADF4(C16) and Tat-eADF4(C16)Tat do not have this T7-tag due to the cloning and expression system. Due to the T7-tag eADF4(C16) has a higher molecular weight than Tat-eADF4-(C16), and eADF4(C16)Tat has a higher molecular weight than Tat-eADF4(C16) and Tat-eADF4(C16)Tat.

Spider silk particle formation

Lyophilized proteins were dissolved in 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate (EMim[acetate]) and stirred for 1 h at 95 °C. Particle formation was initiated by mixing 0.1 mg ml⁻¹ of

Table 1 Theoretical pI and MW of recombinant spider silk proteins calculated using ProtParam^{53,54}

	pI	Molecular weight/Da
eADF4(k16)	9.70	47 683
Tat-eADF4(C16)Tat	6.36	49 172
eADF4(C16)R ₈ G	4.57	49 005
eADF4(C16)Tat	4.57	49 174
Tat-eADF4(C16)	4.46	47 696
eADF4(C16)RGD	3.64	48 583
eADF4(C16)	3.48	47 698



protein in EMiM[acetate] with 5 fold v/v excess of 2 M potassium phosphate, pH 8.^{23,55} After incubation for 1 h at 25 °C, the particles were centrifuged (15 min, 17 000g, 4 °C) and washed three times with ultrapure water.

Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements

Spider silk and control particles (sicastar®-redF, surface modified with COOH or NH₂ groups, micromod, Rostock, Germany) were analyzed for their particle size (Z-average and width) and distribution indices using dynamic light scattering (ZetaSizer NanoZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The samples were measured ($n = 6$; eADF4(c16)Tat $n = 4$) in MQ-H₂O at a protein concentration of 0.5 mg ml⁻¹ at 25 °C. The electrophoretic mobilities of all spider silk particles were measured in 10 mM KCl, pH 5.5 at 25 °C (ZetaSizer NanoZS). The zeta potential was calculated according to the theory of Smoluchowski⁵⁶ based on the measured electrophoretic mobilities.

Scanning electron microscopy

20 µl of particle suspension were pipetted on Thermanox™ plastic cover slips and air-dried. Samples were sputtered with a 2 nm layer of platinum (Sputter coater 208 HR, Cressington, Watford, UK) and analyzed using a Leo 1530 VP Gemini SEM (Zeiss, Germany) at 2–3 kV.

Cell samples were fixed with 2.5% v/v glutaraldehyde, 80 mM HEPES, 3 mM CaCl₂, pH 7.3, and washed twice with fixation buffer without glutaraldehyde for 15 min. After washing two times with ultrapure water, the samples were dehydrated by incubation for 20 min in 25%, 50%, 70%, 95%, each, and three times in 100% acetone. Afterwards, all samples were critically point dried (transitional medium CO₂, Balzers CPD 020), sputtered with a 2 nm layer of platinum and analyzed using a Leo 1540 CrossBeam VP Gemini SEM.

Colloidal stability analysis

Colloidal stability of spider silk and control particles was analyzed in 10 mM KCl, pH 5.5 using a LUMiFuge®114 (L.U.M. GmbH, Berlin, Germany) with a rotation frequency of 300, 600 and 900 rpm and different time intervals of 200, 300, and 1000 s. Particle suspensions were placed in tubes in horizontal positions on the disc of the LUMiFuge®114. Transparency of the suspensions was measured in the area between menisci and sediment in duplicates, three times for each protein using fresh preparations each time. Transmission was measured every 10 s over 1800 s, and the integral of transmission between meniscus and bottom of the vial was plotted against time.

Cell culture

HeLa cells (ACC-57, German collection of microorganism and cell cultures DSMZ, Leibnitz Institute, Braunschweig, Germany) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Germany) containing 10% v/v fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1% v/v GlutaMAX

(Gibco, Grand Island, USA) and 0.1% gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). The viability of the cells was confirmed by trypan blue staining (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) before seeding the cells for experiments. Cells were cultured in a CO₂-incubator (Haereus, Hanau, Germany) at 95% humidity, 5% CO₂ and 37 °C.

Analysis of cell proliferation (cytotoxicity), proliferation rate and doubling time

For cell proliferation analysis, cells were seeded on treated 96-well cell culture plates (Nunc, Langensfeld, Germany) with a density of 5000 cells cm⁻² for 9 days. Cells were pre-incubated with spider silk or control particles (9.6 ng µl⁻¹) for 24 h at 37 °C. Medium was changed daily followed by analysis of cell vitality using the CellTiter Blue assay. Cells were washed two times with phosphate buffered saline (PBS). Fresh media containing 10% v/v CellTiter Blue reagent® (Promega, Madison, USA) was added, and cells incubated for 2.5 h at 37 °C. Transformation of the blue fluorescent dye resazurin into red fluorescent resorufin ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) was measured using a plate reader (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Germany) with 530 nm excitation and 600 nm emission filters and a counting time of 0.5 s. For each particle type, cell culture experiments were repeated 3 times with 3 replicates.

Proliferation rate (μ) and doubling time (T_d) were calculated using a first order Monod-type kinetic model with the assumption that the mortality rate can be neglected (eqn (1)).

$$X(t) = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

$X(t)$ and X_0 are the concentrations of viable cells at time points t and 0. For more details concerning the calculation of proliferation rate μ see Leal-Egana *et al.*²⁰ The doubling time can be calculated using eqn (2).

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Uptake studies and identification of the uptake mechanism using flow cytometry

HeLa cells were cultured on treated 6-well cell culture plates (Nunc, Langensfeld, Germany) with a density of 30 000 cells cm⁻² in the presence of spider silk or control fluorescent particles for 6, 24, 48 and 72 h. Cells were washed with PBS twice, treated with trypan blue, washed again with PBS and pelleted using 0.05% Trypsin/EDTA and centrifugation (300g, 5 min, 25 °C). Cells were resuspended in fresh media, and uptake was measured using flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman-Coulter, Krefeld, Germany). Cells only appeared fluorescent upon internalization of rhodamine-labeled particles (labeling *via* *N*-Hydroxysuccinimid ester chemistry^{19,57}). Endocytotic inhibitors were used for identification of the underlying uptake mechanism. Cells were seeded at a density of 50 000 cells cm⁻² with spider silk or control silica particles for 6 and 24 h. 100 µM dansylcadaverin (DC) for inhibition of clathrin-mediated endocytosis and 100 µM di-methyl-amiloride (DMA)



for inhibition of macropinocytosis were added to cells 30 min prior to particle addition.

Cell staining for fluorescence microscopy

HeLa cells were cultured on μ -slides (8-well, ibidi GmbH, Martinsried, Germany) at a cell density of 20 000 cells cm^{-2} and incubated for 6, 24, 48 and 72 h with rhodamine-labeled particles at 37 °C. The cells were fixed with 4% w/v paraformaldehyde for 15 min at 25 °C, washed with PBS and permeabilized with 0.1% v/v Triton X-100 for 3 min. After two additional PBS washing steps, cells were incubated with HCS CellMask™ Blue stain (Invitrogen, Darmstadt, Germany) for 30 min and washed again with PBS. All samples were kept in PBS. Fluorescence microscopy was performed using a LifeCell microscope (DMI6000, Leica, Wetzlar, Germany).

Results and discussion

Spider silk protein modification

Recombinant spider silk protein eADF4(C16) has been well investigated in recent years.^{19,22–24,49,55,58–62} Here, the protein was modified with different tags for stimulating internalization of respective protein particles by HeLa cells (Fig. 1). A Tat-peptide was fused either to the carboxy-, the aminotermi- nus or both termini of eADF4(C16), and an R₈- or an RGD-peptide was fused with the aminotermi- nus of eADF4(C16).⁴⁹ To study particle-charge-dependence of cellular uptake, the

recently established positively charged eADF4(κ 16) was used.⁵⁰ In this variant, all glutamic acid residues of eADF4(C16) are replaced by lysine ones rendering the protein polycationic under neutral conditions (in contrast to polyanionic eADF4-(C16)). All modifications were analyzed and confirmed by MALDI-TOF MS (data not shown).

Particle production and characterization

Particles were produced by salting out of the protein dissolved in EMIM[acetate]. In contrast to previously published methods²³ the ionic liquid EMIM[acetate] was used to minimize the particle diameter and distribution. In addition to “single-protein” particles also eADF4(C16) and eADF4(κ 16) blend particles were produced.

All spider silk particles had spherical morphologies (Fig. 2A, Fig. S1†), indicating that modifying the sequence as well as blending had no influence on particle formation. Particles were also analyzed concerning size and surface potential (Table 2). Commercially available silica particles with a theoretical diameter of 100 nm were used as control. Their measured diameter was 113.5 ± 0.5 nm. Spider silk particles had diameters between 239 and 294 nm except for eADF4(κ 16) (324 nm) and blend particles (393 nm). Importantly, the previously reported broad particle size distribution could be significantly reduced.²⁴ Many studies investigated the uptake of particles produced from different materials such as polystyrene,^{63,64} chitosan based polymers,⁶⁵ silica,⁶⁶ or poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA).⁶⁷ Independently from the

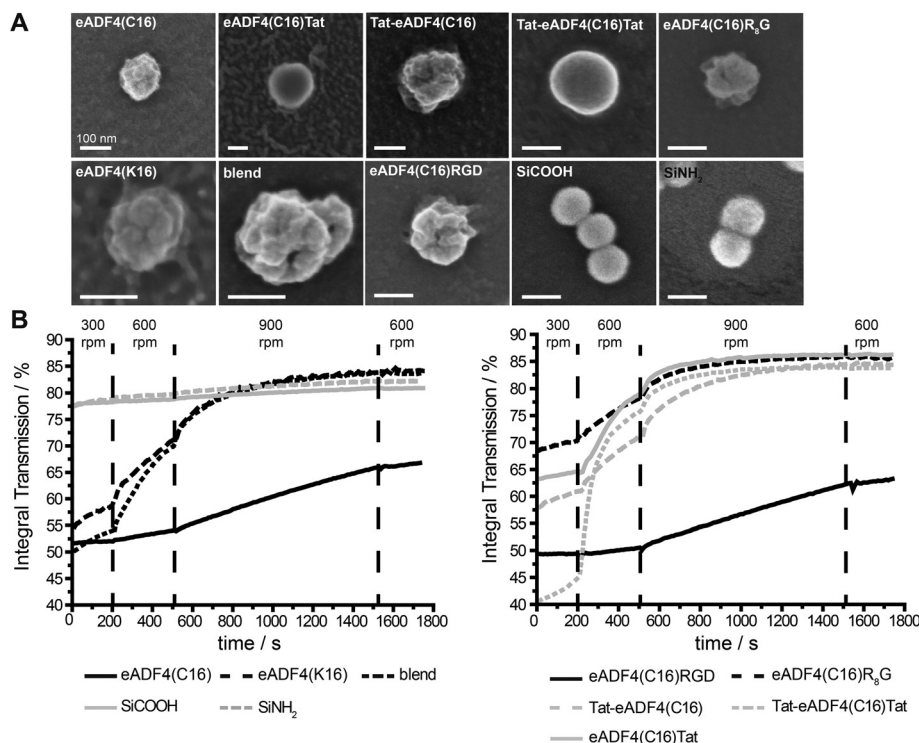


Fig. 2 SEM images (A) and colloidal stability analysis (B) of spider silk and control silica particles. For SEM, spider silk particles were prepared from a 0.1 mg mL^{-1} solution in EMIM[acetate] and analyzed in the dehydrated state. Colloidal stability of particles from a 2 mg mL^{-1} solution was determined in 10 mM KCl, pH 5.5. Scale bars: 100 nm.



Table 2 Particle size, particle size distribution index, zeta potential calculated using the theory of Smoluchowski⁵⁵ and electrophoretic mobility of spider silk and control silica particles. Particle sizes were analyzed in MQ-H₂O, electrophoretic mobilities were measured in 10 mM KCl at pH 5.5 ($n = 6$; eADF4(C16)Tat $n = 4$)

(Spider silk) particles	Particle size/nm	Particle size distribution index	Zeta potential/mV	Electrophoretic mobility/ $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$
eADF4(κ 16)	325 \pm 38	0.193 \pm 0.091	13.2 \pm 5.3	1.04 \pm 0.42
Blend	393 \pm 135	0.545 \pm 0.152	-5.7 \pm 7.5	-0.45 \pm 0.58
Tat-eADF4(C16)Tat	282 \pm 61	0.165 \pm 0.077	-8.4 \pm 5.3	-0.66 \pm 0.42
eADF4(C16)R ₈ G	242 \pm 19	0.123 \pm 0.027	-17.1 \pm 3.3	-1.35 \pm 0.26
eADF4(C16)Tat	294 \pm 50	0.166 \pm 0.136	-23.0 \pm 7.0	-1.80 \pm 0.55
Tat-eADF4(C16)	239 \pm 17	0.106 \pm 0.055	-23.5 \pm 3.6	-1.85 \pm 0.28
eADF4(C16)RGD	263 \pm 7	0.157 \pm 0.074	-24.8 \pm 2.7	-1.88 \pm 0.36
eADF4(C16)	242 \pm 22	0.123 \pm 0.087	-26.7 \pm 2.6	-2.09 \pm 0.20
SiNH ₂	113 \pm 1	0.014 \pm 0.001	-55.0 \pm 1.0	-4.32 \pm 0.08
SiCOOH	114 \pm 2	0.020 \pm 0.015	-55.9 \pm 2.3	-4.39 \pm 0.18

material, the optimal particle size for uptake was in the range of 100–200 nm.

eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, Tat-eADF4(C16) and eADF4-(C16)Tat particles showed zeta potentials between -20 and -30 mV, similar to the previously published zeta potential of eADF4(C16).⁶⁰ Zeta potentials of Tat-eADF4(C16)Tat and eADF4(C16)R₈G were determined to be -8.4 and -17.4 mV, and those of blends varied between -13.2 and +1.8 mV due to the fact that each particle had different amounts of eADF4-(C16) and eADF4(κ 16) (especially on its surface). Particles with a zeta potential below -20 mV typically show little agglomeration in suspension.⁶⁸ Control silica particles showed a surface potential of -55 mV and were therefore quite stable.⁶⁸

Next, all particle suspensions were analyzed concerning their colloidal stability using a LUMiFuge®114 (Fig. 2B). Control silica particles were colloiddally stable (no change in curve behavior) as suggested by their zeta potentials, whereas spider silk particles behaved differently. eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD showed some sedimentation behavior at 300 and 600 rpm and started to sediment above 900 rpm, fitting with the measured zeta potentials of -26.7 and -24.8 mV. As expected, eADF4(C16)R₈G, eADF4(C16)Tat and Tat-eADF4(C16) showed less colloidal stability, and eADF4(κ 16) and blend particles were even less colloiddally stable, with Tat-eADF4(C16) Tat particles being the least stable ones.

Cytotoxicity

Cytotoxicity of spider silk and control silica particles was analyzed using the CellTiter Blue® assay over 9 days after particle addition (24 h). HeLa cells cultured in the presence of spider silk or control silica particles showed indistinguishable growth behavior in comparison to HeLa cells grown in the absence thereof. Proliferation rates (μ) and doubling times (T_d) also showed no significant differences (Table 3). Therefore, none of the particles seemed to have any cytotoxic effect on HeLa cells.

Particle internalization

HeLa cells were incubated with spider silk or control particles for 6, 24, 48 and 72 h at 37 °C and analyzed using flow cytometry (Fig. 3A) or fluorescence microscopy (Fig. 3B, shown for eADF4(C16), eADF4(κ 16) and blends). After 6 h of incubation,

Table 3 Proliferation rates (μ) and doubling times of HeLa cells cultured with spider silk or control silica particles for 9 days. Starting cell density was 5000 cells cm^{-2}

(Spider silk) particles	$\mu_{\text{max}}/\text{d}^{-1}$	Doubling time/h
No particles	0.38 \pm 0.03	43.9 \pm 3.3
eADF4(κ 16)	0.36 \pm 0.03	47.0 \pm 4.7
Blend	0.38 \pm 0.01	44.1 \pm 0.9
Tat-eADF4(C16)Tat	0.37 \pm 0.02	45.3 \pm 3.1
eADF4(C16)R ₈ G	0.37 \pm 0.01	45.2 \pm 1.5
eADF4(C16)Tat	0.36 \pm 0.01	46.8 \pm 0.9
Tat-eADF4(C16)	0.37 \pm 0.01	45.0 \pm 1.2
eADF4(C16)RGD	0.37 \pm 0.01	44.5 \pm 0.7
eADF4(C16)	0.40 \pm 0.01	42.1 \pm 0.7
SiNH ₂	0.38 \pm 0.02	44.3 \pm 2.3
SiCOOH	0.39 \pm 0.04	43.0 \pm 4.2

all spider silk particles were indistinguishably internalized by HeLa cells (between 10 and 30% of cells showed internalized particles) except for eADF4(κ 16) particles where 64% of the cells contained particles (Fig. 3A). After 24 h of incubation, 92% of the cells showed internalized eADF4(κ 16) particles, after 48 h 95% and after 72 h 97%, with all of the cells containing more than one internalized particle (Fig. 3B). Similar internalization numbers have been previously reported for particles produced from silk fibroin and albumin.²⁵ As expected, polyanionic eADF4(C16) particles were internalized by only 19% of the HeLa cells after 24 h, with the amount of cells not increasing after 48 and 72 h.

Blend particles were internalized from about 45% of the cells after 24 h, 57% after 48 h and 60% after 72 h, thus, the number of cells with internalized blend particles was between that of cells containing eADF4(C16) and eADF4(κ 16) particles. Further, each cell (5000 cells measured per set) contained on average more blend particles than eADF4(C16) particles, but less than eADF4(κ 16) particles. This result was expected since cells usually show a negative surface potential (HeLa cells approximately -50 mV⁶⁹), and, therefore, charge-charge interactions with positively charged particles are pronounced.

The number of cells containing particles made of all CPP-fusion proteins was increased in comparison to that of eADF4-(C16) alone. No significant differences were obtained when the



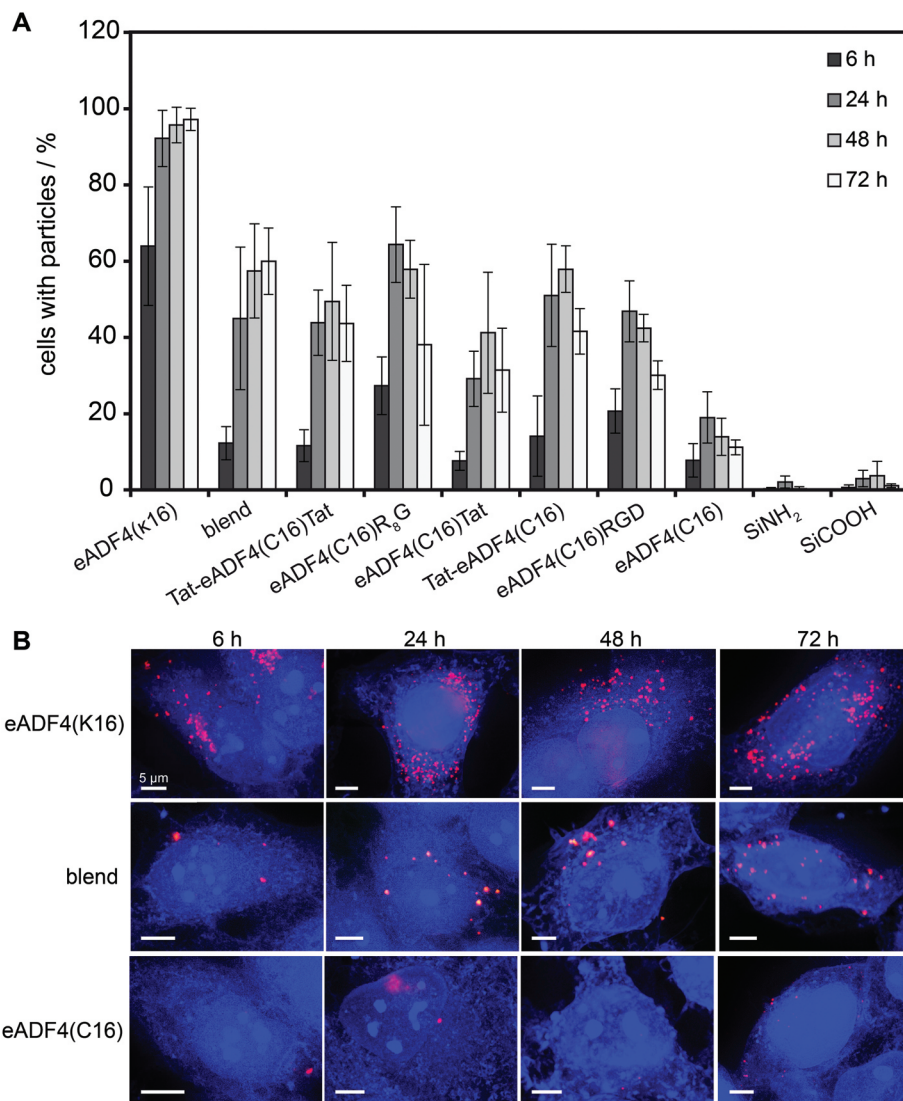


Fig. 3 Flow cytometry analysis (A) and fluorescence microscopy images (B; maximal projections) of HeLa cells incubated in the presence of $9.6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ of spider silk or control silica particles for 6, 24, 48, and 72 h (A). Cells were washed and treated with trypan blue, quenching the fluorescence of labeled particles outside the cells. (B) Cells were fixed, permeabilized and stained with HCS CellMask™ Blue Stain. Scale bars: $5 \mu\text{m}$.

Tat peptide was fused to the amino- or carboxyterminus or to both. Interestingly, the uptake of the CPP- and RGD-fusion particles was similar to that of blend particles.

Identification of the internalization mechanism of spider silk particles

To get a closer look at the internalization mechanism of spider silk particles, SEM visualization of cell surfaces was performed. The particles could be seen in different stages of internalization (Fig. 4). Furthermore, HeLa cells were cultured in the presence of different endocytotic inhibitors (dansylcadaverine (DC): inhibitor of clathrin-mediated endocytosis; dimethyl-amiloride (DMA): inhibitor of macropinocytosis^{51,70–72}) before adding the silk particles. After particle addition, the

cells were incubated for 6 and 24 h and analyzed using flow cytometry (Table 4 and Table S1†).

The number of cells containing eADF4(C16) particles was reduced from 7.8% to 5.4% after 6 h and from 19% to 8.5% after 24 h in the presence of DC. Further, particles made of eADF4(C16) were the only ones being internalized by less cells in the presence of DMA after 6 h (2.4%) compared to internalization by cells in the presence of DC. After 24 h of incubation, the number of cells containing eADF4(C16) particles in the presence of DMA (7.7%) was again similar to that of cells in the presence of DC. The number of cells containing eADF4(C16) particles was reduced from 7.8% to 5.4% after 6 h and from 19% to 8.5% after 24 h in the presence of DC. Further, particles made of eADF4(C16) were the only ones being internalized by less cells in the presence of DMA after 6 h (2.4%)



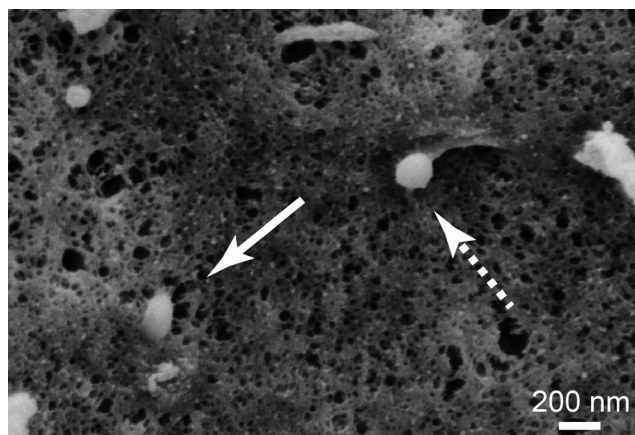


Fig. 4 SEM image of eADF4(κ 16) particle uptake by HeLa cells after 24 h of incubation. The cells were fixed, dehydrated and critical point dried. The arrows indicate a particle on the surface (dashed) and a particle which is half-way internalized (line) at the moment the cells were fixed. Scale bar: 200 nm.

Table 4 Cells at a starting density of 50 000 cells cm^{-2} were incubated in the presence of particles for 24 h in the absence and presence of endocytosis inhibitors (100 μM of dansylcadaverine (DC) or di-methyl-amiloride (DMA)) at 37 $^{\circ}\text{C}$. Inhibitors were added 30 min before particle addition

(Spider silk) particles	Cells with particles/%		
	–	+ DC	+ DMA
eADF4(κ 16)	92.2 \pm 7.4	47.3 \pm 12.5	72.9 \pm 7.1
blend	44.9 \pm 18.7	16.6 \pm 6.7	29.0 \pm 17.5
eADF4(C16) R_8G	64.5 \pm 9.9	23.4 \pm 5.9	63.7 \pm 14.9
Tat-eADF4(C16)	51.0 \pm 13.4	11.1 \pm 0.6	26.7 \pm 15.7
eADF4(C16)RGD	46.9 \pm 8.0	19.9 \pm 10.5	33.7 \pm 8.4
eADF4(C16)	19.0 \pm 6.7	8.5 \pm 3.4	7.7 \pm 4.9
SiNH_2	2.1 \pm 1.6	3.2 \pm 2.3	2.9 \pm 1.9
SiCOOH	3.0 \pm 2.2	3.1 \pm 1.6	2.2 \pm 2.2

compared to internalization by cells in the presence of DC. After 24 h of incubation, the number of cells containing eADF4(C16) particles in the presence of DMA (7.7%) was again similar to that of cells in the presence of DC.

eADF4(κ 16) particle internalization was severely inhibited with DC after 6 h (27.3%) and 24 h (47.3%) whereas in the presence of DMA the internalization was less inhibited after 6 h (44%) and 24 h (73%). Accordingly, numbers of cells with blend, Tat-eADF4(C16), eADF4(C16) R_8G or eADF4(C16)-RGD particles decreased moderately in the presence of DMA in comparison to that in the presence of DC (Table 4) indicating that macropinocytosis plays a minor and clathrin-mediated endocytosis a major role in silk particle uptake in the used experimental setup.

Generally, three different groups can be identified which differ in particle internalization. The first group is eADF4(C16) particles with indistinguishable inhibition of internalization in the presence of both inhibitors. The second group contains Tat-eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, and blend particles with a decreased cellular uptake in the presence of DC and a slightly

less decreased uptake in the presence of DMA indicating that clathrin-mediated endocytosis is the main route of particle uptake with macropinocytosis playing a medium role. Unexpectedly, macropinocytosis played a more important role in case of eADF4(C16)RGD, despite most well-known receptors involved in receptor-mediated endocytosis (e.g. LDL receptor⁷³) being internalized *via* clathrin-mediated endocytosis. Here, the amino acid sequence of the RGD peptide (GRGDSP) is optimized for the recognition by $\alpha 5\beta 1$ - and $\alpha v\beta 3$ -integrin.^{49,74} These integrin receptors are internalized by clathrin-dependent and -independent as well as caveolin-mediated endocytosis^{75–80} which would explain the involvement of macropinocytosis in eADF4(C16)RGD particle internalization. The third group represents eADF4(κ 16) and eADF4(C16) R_8G particles which were internalized by most cells. Here, uptake is severely inhibited in the presence of DC, whereas inhibition of uptake is only moderate in the presence of DMA, indicating that here macropinocytosis only plays a minor role.

The fact that eADF4(κ 16) and eADF4(C16) R_8G internalization is higher than that of other modified particles (Fig. 3) makes them promising candidates for drug delivery vehicles.

Conclusions

A new route for producing spider silk particles has been established using the ionic liquid EMim[acetate] as a starting solvent. Particles made therefrom show small diameters and are quite homogenous with a narrow particle size distribution. Beneath previously employed engineered spider silk proteins several variants with different (cell penetrating) peptide tags were used to produce particles. The tags and blending of proteins had no influence on particle formation but on the electrophoretic mobility, zeta potential and therefore on the colloidal stability. Interestingly, the uptake efficiency of spider silk particles by HeLa cells was highest in the presence of a poly-arginine tag (zeta potential -17.1 mV) or when using the polycationic mutant (without tag) eADF4(κ 16) (zeta potential 13.2 mV) in which all naturally occurring glutamic acid residues have been replaced by lysine ones. Both the number of cells containing spider silk particles as well as the number of internalized particles was increased (Fig. 3B). Uptake mostly occurred through clathrin-mediated endocytosis for all used spider silk particles as determined by using dansylcadaverine. In combination with the recently reported encapsulation efficiency of low molecular weight drugs, low molecular weight proteins or even nucleic acids by eADF4(κ 16) particles,⁵⁰ engineered silk particles show high potential as novel drug delivery systems.

Acknowledgements

We gratefully thank Nicolas Helfricht for the assistance with zeta potential measurements, Jasmin Schmidt for help/discussion on colloidal stability, Marino Zerial and Undine Schubert



for experimental help and inspiring discussion, Johannes Diehl and Andreas Schmidt for fermentation of eADF4(C16)_{R8}G, eADF4(C16)RGD and eADF4(κ16), and Stefanie Wohlrab, Martin Humenik, Christian Borkner and Eileen Lintz for fruitful discussions and comments on the manuscript.

References

- 1 R. Langer and N. A. Peppas, *AIChE J.*, 2003, **49**, 2990–3006.
- 2 Y. B. Choy, F. Cheng, H. Choi and K. K. Kim, *Macromol. Biosci.*, 2008, **8**, 758–765.
- 3 C. Berkland, K. Kim and D. W. Pack, *J. Controlled Release*, 2001, **73**, 59–74.
- 4 J. Herrmann and R. Bodmeier, *J. Controlled Release*, 1995, **36**, 63–71.
- 5 E. Wenk, A. J. Wandrey, H. P. Merkle and L. Meinel, *J. Controlled Release*, 2008, **132**, 26–34.
- 6 S. Hofmann, C. T. Wong Po Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, H. P. Merkle and L. Meinel, *J. Controlled Release*, 2006, **111**, 219–227.
- 7 S. Freiberg and X. X. Zhu, *Int. J. Pharm.*, 2004, **282**, 1–18.
- 8 S. Grund, M. Bauer and D. Fischer, *Adv. Eng. Mater.*, 2011, **13**, B61–B87.
- 9 A. H. Faraji and P. Wipf, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 2950–2962.
- 10 S. K. Nitta and K. Numata, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 1629–1654.
- 11 K. Numata, B. Subramanian, H. A. Currie and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5775–5784.
- 12 A. S. Gobin, R. Rhea, R. A. Newman and A. B. Mathur, *Int. J. Nanomed.*, 2006, **1**, 81–87.
- 13 B. Subia, S. Chandra, S. Talukdar and S. C. Kundu, *Integr. Biol.*, 2014, **6**, 203–214.
- 14 L. Meinel and D. L. Kaplan, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 1111–1122.
- 15 B. Kundu, R. Rajkhowa, S. C. Kundu and X. Wang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 457–470.
- 16 A. B. Mathur and V. Gupta, *Nanomed.*, 2010, **5**, 807–820.
- 17 U. Slotta, M. Tammer, F. Kremer, P. Koelsch and T. Scheibel, *Supramol. Chem.*, 2006, **18**, 465–471.
- 18 K. Spiess, S. Wohlrab and T. Scheibel, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4168–4174.
- 19 K. Schacht and T. Scheibel, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 2488–2495.
- 20 A. Leal-Egaña, G. Lang, C. Mauerer, J. Wickinghoff, M. Weber, S. Geimer and T. Scheibel, *Adv. Eng. Mater.*, 2012, **14**, B67–B75.
- 21 K. D. Hermanson, D. Huemmerich, T. Scheibel and A. R. Bausch, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1810–1815.
- 22 C. Blüm, A. Nichtl and T. Scheibel, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**, 763–768.
- 23 U. K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb and T. Scheibel, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 4592–4594.
- 24 A. Lammel, M. Schwab, U. Slotta, G. Winter and T. Scheibel, *ChemSusChem*, 2008, **1**, 413–416.
- 25 B. Subia and S. C. Kundu, *Nanotechnology*, 2013, **24**, 035103.
- 26 F. P. Seib, G. T. Jones, J. Rnjak-Kovacina, Y. Lin and D. L. Kaplan, *Adv. Healthcare Mater.*, 2013, **2**, 1606–1611.
- 27 E. Gros, S. Deshayes, M. C. Morris, G. Aldrian-Herrada, J. Depollier, F. Heitz and G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 384–393.
- 28 B. Gupta, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2005, **57**, 637–651.
- 29 G. P. Dietz and M. Bahr, *Mol. Cell. Neurosci.*, 2004, **27**, 85–131.
- 30 M. Mae and U. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2006, **6**, 509–514.
- 31 T. Lehto, K. Kurrikoff and U. Langel, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2012, **9**, 823–836.
- 32 P. Jarver, K. Langel, S. El-Andalousi and U. Langel, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 770–774.
- 33 B. R. Meade and S. F. Dowdy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, **60**, 530–536.
- 34 M. Green, M. Ishino and P. M. Loewenstein, *Cell*, 1989, **58**, 215–223.
- 35 E. Vives, P. Brodin and B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 16010–16017.
- 36 S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 5836–5840.
- 37 P. Guterstam, F. Madani, H. Hirose, T. Takeuchi, S. Futaki, S. El Andalousi, A. Graslund and U. Langel, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 2509–2517.
- 38 C. Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I. D. Alves, G. Chassaing and S. Sagan, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33957–33965.
- 39 K. S. Kawamura, M. Sung, E. Bolewska-Pedyczak and J. Gariepy, *Biochemistry*, 2006, **45**, 1116–1127.
- 40 D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman and J. B. Rothbard, *J. Pept. Res.*, 2000, **56**, 318–325.
- 41 I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugiura and S. Futaki, *Mol. Ther.*, 2004, **10**, 1011–1022.
- 42 I. Nakase, Y. Konishi, M. Ueda, H. Saji and S. Futaki, *J. Controlled Release*, 2012, **159**, 181–188.
- 43 G. Ter-Avetisyan, G. Tuennemann, D. Nowak, M. Nitschke, A. Herrmann, M. Drab and M. C. Cardoso, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 3370–3378.
- 44 S. A. Nasrollahi, S. Fouladdel, C. Taghibiglou, E. Azizi and E. S. Farboud, *Int. J. Dermatol.*, 2012, **51**, 923–929.
- 45 D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste and U. Langel, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1972–1994.
- 46 F. Madani, S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki and A. Graslund, *J. Biophys.*, 2011, **2011**, 414729.
- 47 N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai and G. C. Wong, *FEBS Lett.*, 2010, **584**, 1806–1813.
- 48 S. Yigit, O. Tokareva, A. Varone, I. Georgakoudi and D. L. Kaplan, *Macromol. Biosci.*, 2014, **14**, 1291–1298.



- 49 S. Wohlrab, S. Müller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egana and T. Scheibel, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6650–6659.
- 50 E. Doblhofer and T. Scheibel, *J. Pharm. Sci.*, 2014, DOI: 10.1002/jps.24300.
- 51 A. I. Ivanov, in *Exocytosis and Endocytosis*, ed. A. I. Ivanov, Humana Press, Totowa, 2008, vol. 440, ch. 2, pp. 15–33.
- 52 D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph and T. Scheibel, *Biochemistry*, 2004, **43**, 13604–13612.
- 53 E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel and A. Bairoch, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 3784–3788.
- 54 E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch, in *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. J. M. Walker, Humana Press Inc., Totowa, 2005, pp. 571–607.
- 55 K. Spiess, A. Lammel and T. Scheibel, *Macromol. Biosci.*, 2010, **10**, 998–1007.
- 56 R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, Academic Press Inc., San Diego, 1981.
- 57 M. Humenik and T. Scheibel, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1342–1349.
- 58 M. Humenik, M. Magdeburg and T. Scheibel, *J. Struct. Biol.*, 2014, **186**, 431–437.
- 59 C. Blüm and T. Scheibel, *BioNanoScience*, 2012, **2**, 67–74.
- 60 N. Helfricht, M. Klug, A. Mark, V. Kuznetsov, C. Blum, T. Scheibel and G. Papastavrou, *Biomater. Sci.*, 2013, **1**, 1166–1171.
- 61 M. P. Neubauer, C. Blüm, E. Agostini, J. Engert, T. Scheibel and A. Fery, *Biomater. Sci.*, 2013, **1**, 1160–1165.
- 62 A. Leal-Egana and T. Scheibel, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 14330–14336.
- 63 S. A. Kulkarni and S. S. Feng, *Pharm. Res.*, 2013, **30**, 2512–2522.
- 64 R. Firdessa, T. A. Oelschlaeger and H. Moll, *Eur. J. Cell Biol.*, 2014, **93**, 323–337.
- 65 C. B. He, Y. P. Hu, L. C. Yin, C. Tang and C. H. Yin, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3657–3666.
- 66 J. Zhu, L. Liao, L. Zhu, P. Zhang, K. Guo, J. Kong, C. Ji and B. Liu, *Talanta*, 2013, **107**, 408–415.
- 67 K. Y. Win and S. S. Feng, *Biomaterials*, 2005, **26**, 2713–2722.
- 68 R. H. Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 1996.
- 69 I. Szabo, S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini and M. Zoratti, *EMBO J.*, 1999, **18**, 5517–5527.
- 70 R. J. Davis and M. P. Czech, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 2543–2551.
- 71 S. Schutze, T. Machleidt, D. Adam, R. Schwandner, K. Wiegmann, M. L. Kruse, M. Heinrich, M. Wickel and M. Kronke, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 10203–10212.
- 72 M. Koivusalo, C. Welch, H. Hayashi, C. C. Scott, M. Kim, T. Alexander, N. Touret, K. M. Hahn and S. Grinstein, *J. Cell Biol.*, 2010, **188**, 547–563.
- 73 H. Jeon and S. C. Blacklow, *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, **74**, 535–562.
- 74 U. Hersel, C. Dahmen and H. Kessler, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4385–4415.
- 75 T. Pellinen, S. Tuomi, A. Arjonen, M. Wolf, H. Edgren, H. Meyer, R. Grosse, T. Kitzing, J. K. Rantala, O. Kallioniemi, R. Fassler, M. Kallio and J. Ivaska, *Dev. Cell*, 2008, **15**, 371–385.
- 76 F. Shi and J. Sottile, *J. Cell Sci.*, 2008, **121**, 2360–2371.
- 77 B. G. Galvez, S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, M. Vicente-Manzanares, F. Sanchez-Madrid and A. G. Arroyo, *Mol. Biol. Cell*, 2004, **15**, 678–687.
- 78 T. Nishimura and K. Kaibuchi, *Dev. Cell*, 2007, **13**, 15–28.
- 79 L. Liu, B. He, W. M. Liu, D. Zhou, J. V. Cox and X. A. Zhang, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 31631–31642.
- 80 P. T. Caswell, S. Vadrevu and J. C. Norman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, **10**, 843–853.



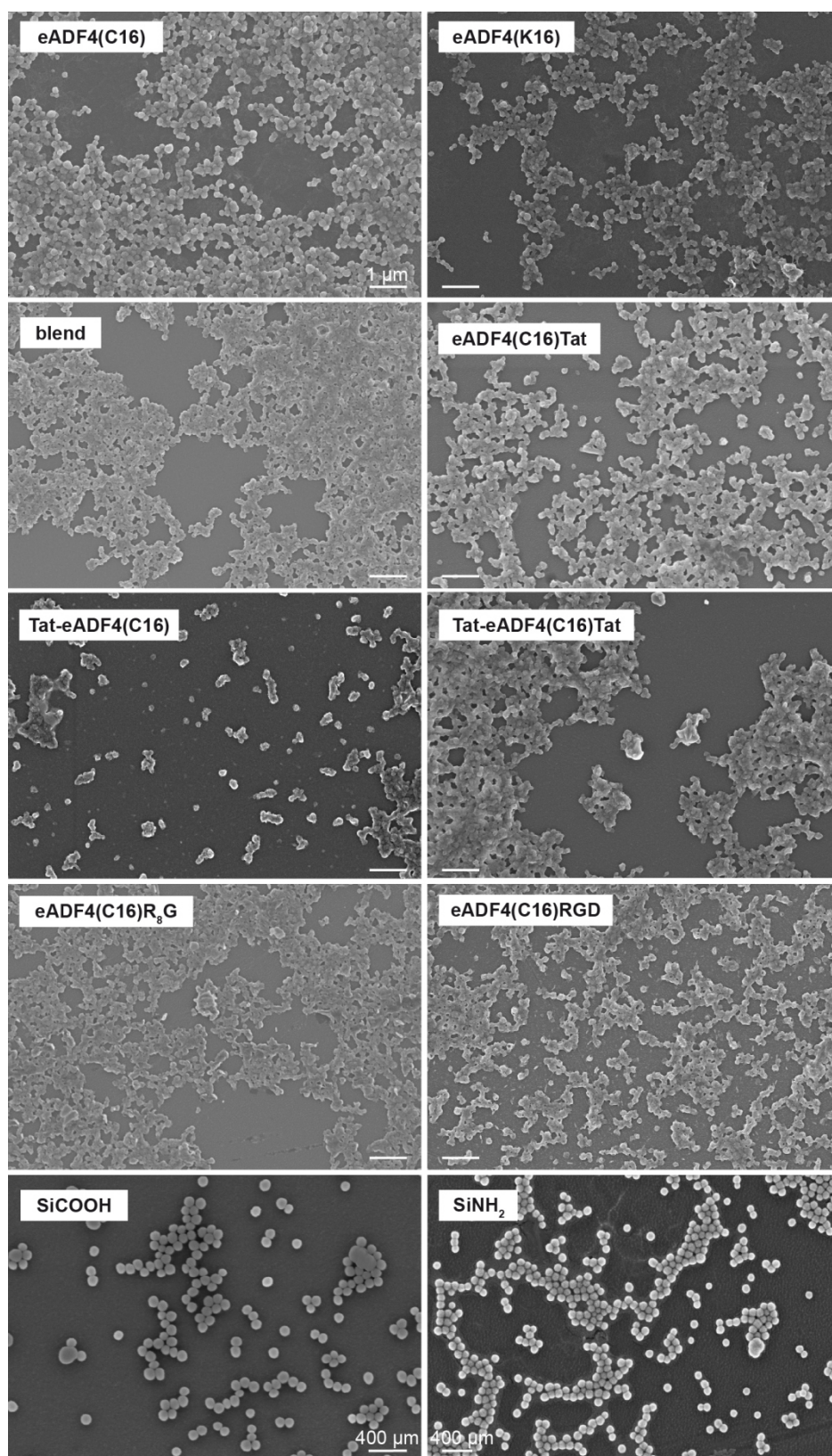


Fig. 1 Images (SEM) of spider silk and silica particles. Spider silk particles were prepared from a 0.1 mg/ml solution in EMIM[acetat] and analyzed in the dehydrated state. Scale bars: 1 μm (spider silk particles); 400 nm (silica particles)

Table S 1

Cells at a starting density of 50,000 cells/cm² were incubated in the presence of particles for 6 h in the absence and presence of endocytosis inhibitor (100 μ M of dansylcadaverine (DC) or di-methyl-amiloride (DMA)) at 37 °C.

Inhibitors were added 30 min before particle addition.

	Cells with particles / %	Cells with particles / % + DC	Cells with particles / % + DMA
eADF4(κ 16)	63.9 \pm 15.5	27.3 \pm 13.9	44.0 \pm 13.6
blend	12.3 \pm 4.4	3.4 \pm 1.6	5.5 \pm 2.0
eADF4(C16)R ₈ G	27.3 \pm 7.5	17.8 \pm 8.0	20.7 \pm 14.6
Tat-eADF4(C16)	14.1 \pm 10.5	7.0 \pm 2.1	11.3 \pm 7.4
eADF4(C16)RGD	20.7 \pm 5.8	15.3 \pm 2.1	12.6 \pm 4.0
eADF4(C16)	7.8 \pm 4.4	5.4 \pm 0.1	2.4 \pm 0.7
SiNH ₂	0.3 \pm 0.3	1.5 \pm 0.6	0.4 \pm 0.8
SiCOOH	0.6 \pm 0.7	2.5 \pm 0.9	2.1 \pm 0.6

7.2 Teilarbeit II

Die Veröffentlichung der Ergebnisse dieses Kapitels erfolgte unter:

„Cellular uptake of drug loaded spider silk particles“

Schierling, M. B. *, Doblhofer, E.* and Scheibel, T.

Manuskript eingereicht

*gleichberechtigte Co-Autorenschaft

Cellular uptake of drug loaded spider silk particles

Martina B. Schierling^{a*}, Elena Doblhofer^{a*}, Thomas Scheibel^{a,f}

^a *Lehrstuhl Biomaterialien,*

^b *Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG),*

^c *Bayreuther Zentrum für Bio-Makromoleküle (bio-mac),*

^d *Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB),*

^e *Bayreuther Materialzentrum (BayMAT),*

^f *corresponding author, Phone: +49 (0) 921 55 7361, Fax: +49 (0) 921 55 7346,*

E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

all Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, Bayreuth D-95447, Germany

**contributed equally*

Abstract

Medical therapies are often accompanied by not-wanted side-effects or, even worse, targeted cells can develop drug resistance leading to an ineffective treatment. Therefore, drug delivery systems are under investigation to lower the risk thereof. Drug carriers should be biocompatible, biodegradable, nontoxic, non-immunogenic, and should show controllable drug loading and release properties. Previous studies qualified spider silk particles as drug delivery carriers, however, cellular uptake was only tested with unloaded spider silk particles. Here, the effect of drug loading on cellular uptake of previously established spider silk-based particles made of eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, eADF4(C16)R₈G and eADF4(κ16) was investigated. Fluorescently labeled polyethylenimine was used as a model substance for loading eADF4(C16), eADF4(C16)RGD or eADF4(C16)R₈G particles, and fluorescently labelled ssDNA was used for loading eADF4(κ16) particles. Upon loading polyanionic eADF4(C16) and eADF4(C16)RGD particles with polycationic polyethyleneimine, the cellular uptake efficiency was increased, while the uptake of eADF4(C16)R₈G and polycationic eADF4(κ16) particles was decreased upon substance loading. The latter could be circumvented by coating substance-loaded eADF4(κ16) particles with an additional layer

of eADF4(κ 16) (layer-by-layer coating). Further, it could be shown that eADF4(C16)RGD and eADF4(κ 16) uptake was based on clathrin-mediated endocytosis, whereas macropinocytosis was more important in case of eADF4(C16) and eADF4(C16)R₈G particle uptake. Finally, it was confirmed that drugs, such as doxorubicin, can be efficiently delivered into and released within cells when spider silk particles were used as a carrier.

1. Introduction

The severe side-effects of some conventional medical therapies strongly influence quality of life or cause even mortality. To minimize these effects, drug delivery systems are envisioned to direct drugs to specific tissues or even inside targeted cells. These systems have to fulfil several requirements like controllable physicochemical properties, colloidal stability, the shielding of drug degradation by hydrolysis or enzymatic reactions as well as the controllable release of the drug at the target tissue or within the target cell [1]. Polymers are the preferred material for carrier systems because they can be modified according to the desired application. Additionally, polymers can be tuned for controllable interactions with drugs allowing a defined drug release over days or even months [2, 3]. Unfortunately, several synthetic polymers are not biocompatible or need organic solvents and harsh formulation conditions during processing or generate toxic degradation products. Natural polymers, in contrast, are biocompatible, can often be processed under mild conditions, and can be degraded by enzymatic reactions without yielding toxic side products [4, 5]. Drug carriers made of natural polymers can further be modified to enhance their cellular uptake specificity by modifications with cell interacting motifs like the RGD sequence or cell penetrating peptides (CPP) [6-8].

Among biopolymers, spider silk proteins and materials made thereof are promising candidates in the field of biomedical applications due to their biocompatibility, biodegradability and mechanical properties [9]. Since natural spider silk proteins are not available in high amounts due to the cannibalistic behavior of spiders, recombinant production techniques of the proteins have been developed [10, 11]. The well-established recombinant spider silk protein eADF4(C16) is based on one major ampullate spidroin (MaSp) of the dragline silk of the European garden spider (*Araneus diadematus*) [12]. eADF4(C16) can be processed into different morphologies like films [13, 14], non-woven mats [15], hydrogels [16], capsules [17, 18] and particles [19, 20]. The particles can be loaded with different low molecular weight substances or small proteins [21-23]. Due to the negative net charge of eADF4(C16) at neutral pH (based on 16 glutamic acid residues) only positively charged or neutral substances can be loaded onto particles made therefrom. Replacement of all glutamic acid residues by lysines yielded the engineered positively charged spider silk protein, eADF4(κ 16) [23]. eADF4(κ 16) particles can be loaded with negatively charged substances with low and high molecular weights [23]. Previously it could be shown that HeLa cells take up eADF4(κ 16) particles quite well. Also particles made of fusions between eADF4(C16) and the cell penetrating peptide

R₈G or the integrin-binding peptide RGD are taken up but to a lower extent, and the lowest cellular uptake was detected for eADF4(C16) particles [24].

Since drug loading influences the surface properties of spider silk particles, this particular feature has been investigated in this study concerning its impact on the cellular uptake of eADF4(κ 16), eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles. Single stranded DNA was loaded onto eADF4(κ 16) particles, and polyethylenimine was loaded onto eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles as model substances. Loading of such highly charged model substances significantly and differently influenced the cellular uptake of spider silk particles dependent on the silk protein employed. Further, upon using doxorubicin as a model drug it could be shown that drugs can efficiently be delivered into and released within the target cells by using spider silk particles as carrier.

2. Experimental Section

2.1 Protein Production and Purification

The recombinant spider silk proteins eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, eADF4(C16)R₈G and eADF4(κ 16) were produced and purified as described previously [12, 23, 24].

2.2 Coupling of Rhodamine to Spider Silk Proteins

Lyophilized spider silk proteins were dissolved in 6 M guanidinium thiocyanate and dialyzed against 10 mM HEPES, pH 7.0. Dialyzed spider silk proteins were incubated with a 15-fold molar excess of 5/6-carboxy-tetramethyl-rhodamine succinimidyl ester (ThermoFisher, Darmstadt, Germany) in the absence of light for 2 h at 25 °C. Afterwards, the labeled proteins were precipitated by adding 2 M potassium phosphate pH 8.0 in a 1:1 volume ratio, and the mixture was incubated for 1 h at 25 °C. The precipitated, labelled protein was washed three times with ultra-pure water and then lyophilized.

2.3 Spider Silk Particle Formation

The particles were produced according to Elsner et al. [24]. Briefly, lyophilized proteins were dissolved in 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate (EMiM[acetate]). Particle formation was initiated by mixing of 0.1 mg/ml protein in EMiM[acetate] with 5 equivalents (v/v) of 2 M potassium phosphate, pH 8 [19, 24]. After incubation for 1 h at 25 °C, the particles were centrifuged (15 min, 17,000 x g, 4 °C), and then the pellet washed three times with ultra-pure water.

2.4 Fluorescence labeling of DNA and polyethylenimine

1 eq NH₂-ODN (NH₂-C₆-5-ggt cac ttc gtg gct aac g-3 (6971 Da), biomers.net, Ulm, Germany) was dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.9 containing 25 eq NHS-Fl (N-hydroxy succinimidyl fluorescein dissolved in DMSO). After 3 h of incubation the sample was mixed with 4 M sodium acetate pH 5 and ethanol p.a. to final concentrations of 100 mM and 70 %, respectively. For precipitation of the resulting Fl-ODN (Fluorescein-C₆-5-ggt cac ttc gtg gct aac g-3 (7302 Da)) the mixture was incubated for 30 min at -20 °C, centrifuged at 8500 rpm and 4 °C and washed with ethanol p.a.. The Fl-ODN pellet was resuspended, and the precipitation repeated with ethanol p.a. twice. Finally, Fl-ODN was resuspended in ultra-pure water at the appropriate concentrations for particle loading.

Polyethylenimine (PEI; $M_n = 8000$ Da, PDI 1.1, Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) was dissolved in sodium carbonate buffer pH 7.9 at a concentration of 2 mg/ml. Afterwards, NHS-Fl (1 mg/ml in DMSO) was added slowly to the PEI solution while stirring followed by 8 h of incubation at 4 °C. The reaction was stopped by addition of 50 mM ammonium chloride and further 2 h of incubation at 4 °C. To separate remaining NHS-Fl, NH_4Cl or sodium phosphate from the resulting PEI-Fl (fluorescein labelled PEI), the reaction mixture was dialyzed against ultra-pure water for 46 h at 25 °C, using a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 500-1000 Da (SPECTRUM® LABORATORIES, Irving, Texas).

2.5 Loading of Spider Silk Particles

All particles were loaded by diffusion. Fl-ODN was dissolved in ultra-pure water and added to 0.5 mg eADF4(κ 16) particles at various concentrations (0.02, 0.1 and 0.4 nmol/mg particles) in a volume of 100 μl . The particles were incubated in the respective Fl-ODN solution for 1 h, then centrifuged (17,000 x g, 15 min, 25 °C) and washed twice with ultra-pure water.

eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles were loaded with 0.02, 0.1 and 0.4 nmol PEI-Fl/mg protein as described for eADF4(κ 16) particles loaded with Fl-ODN. After 1 h of incubation, the particles were centrifuged (17,000 x g, 15 min, 25 °C) and washed twice with ultra-pure water.

2 mM of doxorubicin (Dox) were incubated with 14.77 μg of plasmid DNA (pEGFP-N1) for 12 h at 25 °C. The DNA/Dox mixture or Dox alone were then added to the eADF4(κ 16) particles and incubated for 2 h at 25 °C, centrifuged (17,000 x g, 15 min, 25 °C) and washed twice with ultra-pure water. The supernatant was analyzed using UV/Vis spectroscopy ($\lambda_{\text{max,Dox}} = 501$ nm) to determine the loading and loading efficiency (equation (1) and (2)). Afterwards, particles were treated using the layer-by-layer (LbL) coating procedure described in section 2.7.

$$\text{Loading (\%)} = \frac{\text{Amount of substance in particles}}{\text{Amount of silk protein}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \frac{\text{Amount of substance in particles}}{\text{Amount of dye added}} \times 100 \quad (2)$$

2.6 Release of Dox from DNA/Dox Loaded eADF4(κ 16) Particles

Release of Dox from eADF4(κ 16) particles was analyzed by UV/Vis spectroscopy at $\lambda_{\text{max,Dox}} = 501$ nm every 30 min in PBS for 180 min at 37 °C. At each time point particles were centrifuged (17,000 x g, 2 min, 25 °C), the supernatant was analyzed, and the pellet

resuspended in fresh PBS. The accumulated release was plotted against time, with the start of the experiment being set to zero minutes. After 180 min of incubation, particles were treated with DNaseI (2000 U/ml), Trypsin (1 μ l/ml) or both for 24 h at 37 °C (10 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, pH 7.5), centrifuged (17,000 x g, 2 min, 25 °C), and the supernatant was analyzed using again UV/Vis spectroscopy to detect released Dox.

2.7 *Layer-by-Layer Coating of Spider Silk Particles*

LbL-Coating of spider silk particles was performed as described previously [23]. Loaded (Fl-ODN, DNA/Dox or Dox) eADF4(κ 16) particles were resuspended in 1 ml of freshly prepared eADF4(κ 16) protein solution at a protein concentration of 0.8 mg/ml. After 1 h of incubation, particles were centrifuged (17,000 x g, 2 min, 25 °C) and washed with ultra-pure water.

2.8 *Electrophoretic Mobility Determination*

Spider silk particles were analyzed concerning their electrophoretic mobility in 1/11 PBS pH 7.4 (0.4 mM KH₂PO₄, 1.6 mM Na₂HPO₄, 11.5 mM NaCl) at 25 °C (ZetaSizer, NanoZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The zeta potential was calculated according to the theory of Smoluchowski [25].

2.9 *Particle Size Determination*

The size of dehydrated particles was analyzed by SEM imaging and subsequent diameter determination using the analytical software *ImageJ*. The number of analyzed particles was at least n = 30.

Scanning electron microscopy (SEM) images were taken using a 1450Es Beam (Zeiss, Germany) at an accelerating voltage of 3 kV. Particles were pipetted onto ThermanoxTM plastic cover slips and washed three times with distilled water. Before imaging, the particles were air dried and sputtered with platinum.

2.10 *Colloidal Stability Analysis*

Colloidal stability of spider silk particles was analyzed in ultra-pure water using a LUMiFuge[®]114 (L.U.M. GmbH, Berlin, Germany) with a rotation frequency of 300, 600 and 900 rpm and different time intervals of 200, 300, and 1000 s. Particle suspensions were placed in tubes in horizontal positions on the disc of the LUMiFuge[®]114. Transparencies of the particle suspensions were measured in the area between the menisci and bottom of the vial three times for each particle type. Transmission was measured

every 10 s over 1800 s, and the integral of transmission between meniscus and bottom of the vial was plotted against time.

2.11 Cell Culture

HeLa cells (German Collection of Microorganism and Cell Cultures DSMZ) and BALB/3T3 mouse fibroblast (European Collection of Cell Culture) were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10 % v/v fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1 % v/v GlutaMAX (Gibco, Grand Island, USA) and 0.1 % v/v gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). Kelly neuroblastoma cells (German Collection of Microorganism and Cell Cultures DSMZ) were cultured in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10 % v/v fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1 % v/v GlutaMAX (Gibco, Grand Island, USA) and 0.1 % v/v gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). The cell viability was confirmed by trypan blue staining (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) before seeding the cells. Cells were cultured in a CO₂-incubator (Heraeus, Hanau, Germany) at 5 % CO₂, 95 % humidity and at 37 °C.

2.12 Analysis of Cytotoxicity

Cells were seeded on treated 96-well cell culture plates (Nunc, Langenselbold, Germany) at a density of 20,000 cells/cm² (HeLa, BALB/3T3) or 50,000 cells/cm² (Kelly). The seeded cells were pre-incubated with spider silk particles (9.6, 48, or 96 ng/μl) for 6 or 24 h at 37 °C. Medium was changed after 6 h, 24 h or 48 h followed by analysis of cell viability using the CellTiter Blue assay. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Fresh medium was added containing 10 % v/v CellTiter Blue reagent[®] (Promega, Madison, USA), and cells were incubated for 2.5 h at 37 °C. The transformation of the blue fluorescent dye resazurin into red fluorescent resorufin ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) was measured using a plate reader (Mithras LB 940, Bertold, Bad Wildbach, Germany) with 530 nm excitation and 600 nm emission filters and a counting time of 0.5 s. Cell culture experiments were repeated 3 times with 3 replicates for each particle type and drug.

2.13 Uptake Analysis and Identification of the Uptake Mechanism

For uptake studies and identification of the uptake mechanism, HeLa cells were cultured on treated 6-well cell culture plates (Nunc, Langenselbold, Germany) at a density of 30,000 cells/cm² in the presence of loaded spider silk particles for 24 h. Cells

were washed with PBS twice, treated with trypan blue, washed again with PBS, detached using 0.05 % Trypsin/EDTA and pelleted by centrifugation (300 x g, 5 min, 25 °C). Cells were resuspended in fresh media, and uptake was measured using flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman-Coulter, Krefeld, Germany). Cells only appeared fluorescent upon internalization of Rhodamine-labeled particles.

Endocytotic inhibitors were used for identification of the uptake mechanism. Cells were seeded at a density of 30,000 cells/cm². 100 µM dansylcadaverine (DC) for inhibition of clathrin-mediated endocytosis and 100 µM di-methyl-amiloride (DMA) for inhibition of macropinocytosis were added to the cells 30 min prior to particle addition (9.6 ng/µl), and all samples were further incubated for 24 h at 37 °C.

For fluorescence microscopy, HeLa cells were cultured on µ-slides (8-well, ibidi GmbH, Martinsried, Germany) at a cell density of 20,000 cells/cm² and incubated with loaded (FI-ODN or FI-PEI) rhodamine-labeled particles for 24 h at 37 °C. The cells were fixed with 4 % w/v paraformaldehyde for 15 min at 25 °C, washed with PBS and permeabilized with 0.1 % v/v Triton-X-100 for 3 min. After two additional washing steps with PBS, cells were incubated with HCS CellMaskTM Blue stain (Invitrogen, Darmstadt, Germany) for 30 min and washed again with PBS. All samples were kept in PBS and analyzed using a fluorescence microscope (DMi8, Leica, Wetzlar, Germany).

2.14 Statistical Analysis

An unpaired two-side t-test was performed with n=5 for eADF4(κ16), n=4 for eADF4(C16) and n=3 for eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles for statistical analysis. The significance was confirmed by a statistical certainty higher than 99.9 % (significance level of <0.1 %; ***) [24].

3. Results and Discussion

Particle Production and Characterization

All recombinant spider silk proteins were dissolved in EMiM[acetate] and then precipitated as described previously yielding particles with low diameters and small size distribution [24]. Particles were loaded by diffusion with different amounts of the model substance FI-ODN in the case of eADF4(κ 16) and PEI-FI in the cases of eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, and eADF4(C16)R₈G (0.02, 0.1 or 0.4 nmol model substance/mg particles). Due to the detection limit, loading efficiencies were only determined for the highest loading amounts. All particles (eADF4(C16) variants) loaded with PEI-FI showed a similar loading efficiency of around 25 %, and no significant difference in the particle's interaction with the model substance was detectable regardless of the underlying protein. The loading efficiency of FI-ODN onto eADF4(κ 16) particles was higher (41 %). This effect could be attributed to a lower molecular weight and a lower charge density of the model substance FI-ODN in comparison to PEI-FI (Table S 1).

SEM imaging showed that the diameter of dehydrated particles was roughly between 200 and 400 nm and no significant deviation was detectable amongst the different spider silk proteins (Table 1, Fig. S 1). In addition, electrophoretic mobility and colloidal stability were indistinguishable in most cases after loading of the particles with either PEI-FI or FI-ODN (Table 1 and Fig. S 2). Analysis of loaded and unloaded eADF4(C16) and eADF4(C16)RGD particles in suspension showed only little sedimentation of the particles in absence as well as in presence of PEI-FI upon exposure to a centrifugal field (LUMIFuge[®]) (Fig. S 2A and B). In the case of eADF4(C16)R₈G, all samples showed increased sedimentation at a centrifugal speed of 900 rpm independent of the loading of the particles (Fig. S 2C). eADF4(κ 16) particles were colloiddally unstable with fast sedimentation at 300 rpm, 600 rpm and 900 rpm (Fig. S2D). The incubation of the particles with FI-ODN had only little influence on their colloidal stability. Surprisingly, coating of loaded eADF4(κ 16) particles with another layer of this protein seemed to stabilize the particles in suspension (Fig S 2D).

The lack of influence of substance-loading on the electrophoretic mobility of the particles (Table 1) is possibly due to very low model substance-protein ratios of 1:52 (0.4 nmol substance/mg protein), 1:208 (0.1 nmol substance/mg protein) and 1:1040

(0.02 nmol substance/mg protein). Further, it can be assumed that most of the uptaken substance is not surface exposed.

Table 1 Particle size, and electrophoretic mobility of unloaded and PEI-FI or FI-ODN loaded spider silk particles measured at an ionic strength of 12 mM (1/11 PBS) and pH 7.4 (n = 6); C: Layer-by-Layer coated particle.

Spider silk particles	Model drug	Loading nmol/mg particles	Electrophoretic mobility / $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	Zeta potential /mV	Particle diameter (dehydrated) /nm
eADF4(C16)	-	-	-2.10 ± 0.10	-26.78 ± 1.25	397 ± 115
	PEI-FI	0.02	-1.97 ± 0.12	-25.15 ± 1.60	
	PEI-FI	0.1	-1.88 ± 0.20	-23.93 ± 2.58	
	PEI-FI	0.4	-1.99 ± 0.08	-25.43 ± 1.05	
eADF4(C16)RGD	-	-	-1.87 ± 0.25	-23.90 ± 3.25	232 ± 56
	PEI-FI	0.02	-1.56 ± 0.07	-19.85 ± 0.85	
	PEI-FI	0.1	-1.54 ± 0.05	-19.67 ± 0.59	
	PEI-FI	0.4	-1.47 ± 0.06	-18.73 ± 0.83	
eADF4(C16)R₈G	-	-	-1.66 ± 0.06	-21.20 ± 0.82	315 ± 69
	PEI-FI	0.02	-1.56 ± 0.06	-19.90 ± 0.79	
	PEI-FI	0.1	-1.65 ± 0.04	-20.95 ± 0.53	
	PEI-FI	0.4	-1.70 ± 0.06	-21.73 ± 0.75	
eADF4(κ16)	-	-	1.15 ± 0.09	14.68 ± 1.20	269 ± 60
	FI-ODN	0.02	1.11 ± 0.08	14.12 ± 0.95	
	FI-ODN	0.1	1.13 ± 0.08	14.43 ± 1.02	
	FI-ODN	0.4	1.16 ± 0.06	14.85 ± 0.73	
eADF4(κ16)-C	FI-ODN	0.4	0.73 ± 0.25	9.36 ± 3.17	-

*calculated according to the theory of Smoluchowski [25]

Uptake analysis of loaded spider silk particles

Previously, eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, and eADF4(C16)R₈G particles showed lower uptake efficiency in comparison to positively charged spider silk protein particles made of eADF4(κ 16) in HeLa cells [23]. Further, it was shown that the release of single stranded DNA (ssDNA) from eADF4(κ 16) particles into buffer was rather slow in comparison to that of low molecular weight substances [23]. Here, eADF4(κ 16) particles were loaded with fluorescently labeled DNA (FI-ODN) to analyze the effect of DNA loading on the cellular uptake, and particles made of eADF4(C16), eADF4(C16)RGD,

eADF4(C16)R₈G were loaded with fluorescently labeled polyethylenimine (PEI-FI), a positively charged polymer.

HeLa cells were incubated with 9.6 ng/μl of loaded eADF4(κ16) particles for 24 h and analyzed using flow cytometry (Fig. 1) or fluorescence microscopy (Fig. 2). Interestingly, the uptake of loaded eADF4(κ16) particles was significantly reduced and depended on the amount of loading (Fig. 1). The higher the loading, the lower the number of cells which contained particles, and also the number of particles per cell was reduced (Fig. 2). Coating of loaded particles with an additional layer of eADF4(κ16) (eADF4(κ16)-0.4-C) increased the number of cells with incorporated particles as well as the average number of particles within each cell.

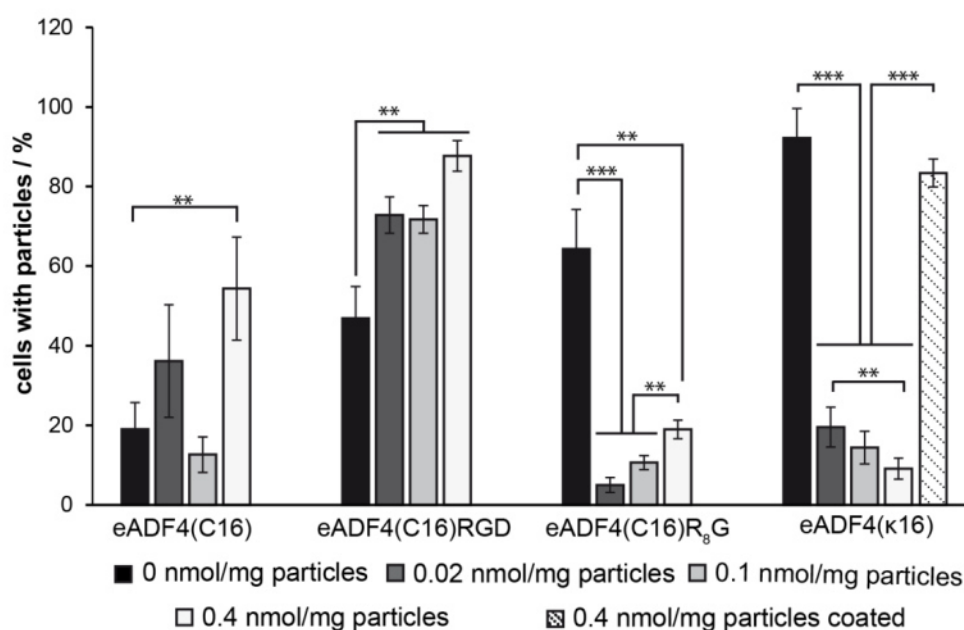


Fig. 1. Flow cytometry analysis of HeLa cells incubated in the presence of loaded spider silk particles. The HeLa cells were incubated together with 9.6 ng/μl of spider silk particles. eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles were loaded with 0, 0.02, 0.1 and 0.4 nmol of PEI-FI and eADF4(κ16) with 0, 0.02, 0.1 and 0.4 nmol of FI-ODN per mg of particles and incubated for 24 h. eADF4(κ16) particles loaded with 0.4 nmol/mg particles of FI-ODN were additionally coated with eADF4(κ16) using a layer-by-layer technique. Before measurements, cells were washed and treated with trypan blue quenching the fluorescence of Rhodamine labeled particles outside the cells. (***)highly significant; ** significant)

HeLa cells were also incubated in the presence of eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles loaded with 0.02, 0.1, and 0.4 nmol PEI-FI /mg particles (eADF4(C16)-0.02, eADF4(C16)-0.1, eADF4(C16)-0.4, etc.). eADF4(C16) particles were internalized in 19.0 % of HeLa cells after 24 h of incubation. Although the uptake efficiency was only slightly affected by loading the particles with 0.02 or 0.1 nmol PEI-FI/mg particles, cells incubated with eADF4(C16)-0.4 particles showed a significantly higher uptake (54.4 %). Unloaded eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles

revealed a cellular uptake in the range between that of eADF4(C16) and eADF4(κ 16) particles. While treatment of HeLa cells with loaded eADF4(C16)RGD particles increased the uptake efficiency to nearly 90 %, the number of cells containing PEI-FI loaded eADF4(C16)R₈G particles was significantly decreased to less than 20 %. Conspicuous here is the fact that, except for eADF4(C16) particles, even the smallest amount of loaded substance induced a divergent interaction between cells and particles.

Loading with PEI-FI increased cellular uptake with increasing loading in the case of eADF4(C16) and eADF4(C16)RGD particles. Most strikingly, in the case of eADF4(C16)R₈G loading with PEI-FI led to a tremendous reduction of internalized particles, which was again reversed to some extent when the PEI-FI concentration within the particles was increased. However, this could not be attributed to changes in surface properties, since loading did apparently not affect the electrophoretic mobility of the particles, as described above. Since it was shown previously that cellular uptake was increased for particles containing the penetrating peptide R₈G compared to plain eADF4(C16) particles, it can only be presumed that an interference of PEI-FI with the R₈G sequence is accountable for the rapid decrease in cellular uptake of loaded eADF4(C16)R₈G particles. In fact, the PEI transfection mechanism has not yet been clarified on a cellular level [26]. Consequently, the conclusions from the obtained results remain open.

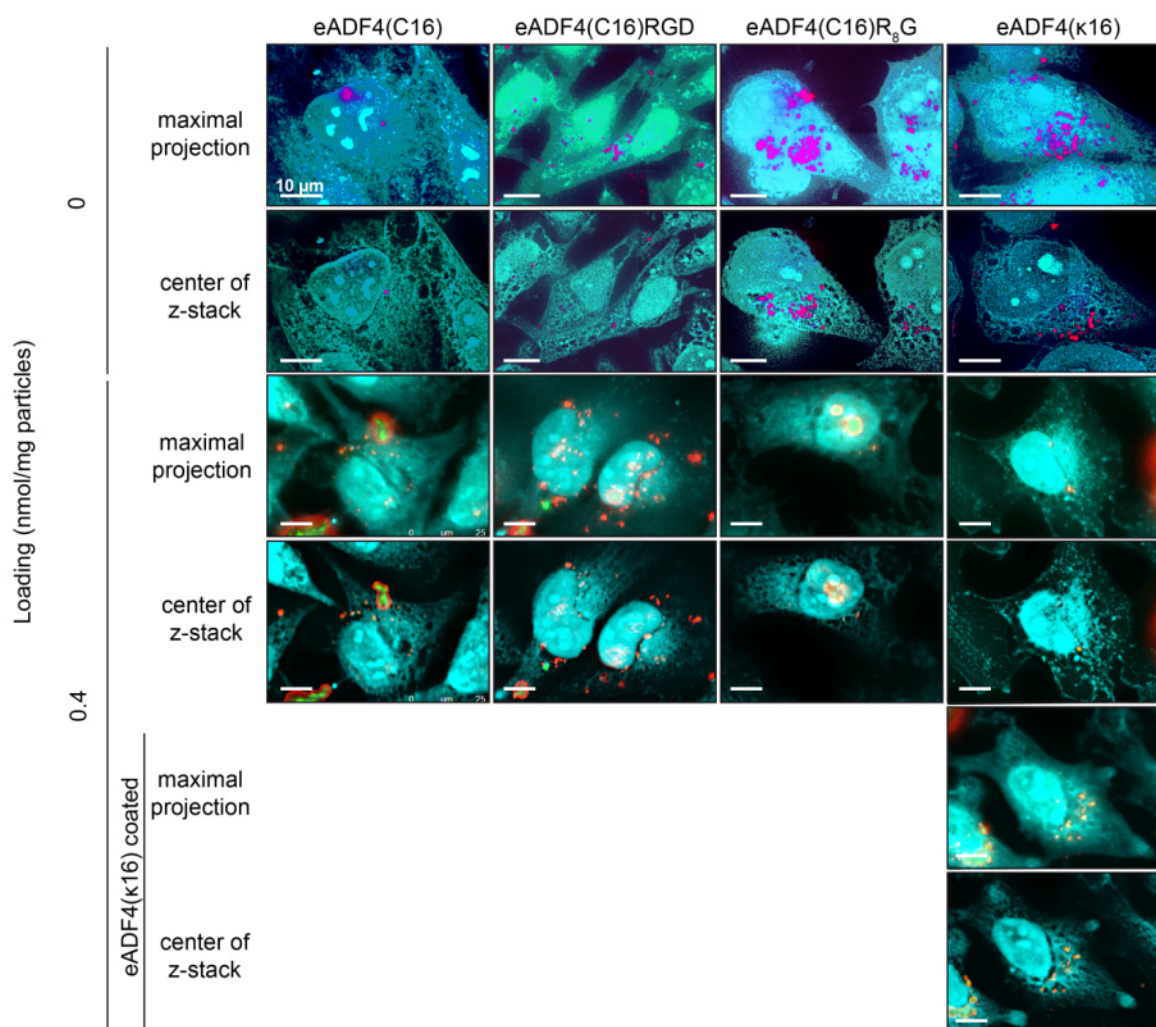


Fig. 2. Fluorescence microscopy images (maximal projections and middle of z-stack) of HeLa cells incubated in the presence of 9.6 ng/ μ l of spider silk particles for 24 h. eADF4(C16), eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R_gG particles were loaded with 0 or 0.4 nmol PEI-FI /mg particles and eADF4(κ 16) particles with 0 or 0.4 nmol FI-ODN/mg particles. As indicated, eADF4(κ 16) particles were also coated with an additional layer of eADF4(κ 16) after FI-ODN loading using the layer-by-layer technique. Cells were fixed, permeabilized and stained with HCS CellMaskTM blue stain. Cells: blue; particles: red; loaded drug (PEI-FI or FI-ODN): green. Scale bar: 10 μ m.

Identification of the uptake mechanism

To investigate the influence of drug loading on the internalization pathway of silk particles, HeLa cells were incubated in the presence of different endocytotic inhibitors (dandylcadaverine (DC): inhibitor of clathrin-mediated endocytosis; di-methyl-amiloride (DMA): inhibitor of macropinocytosis) [27-30] prior to particle incubation for 24 h, and the uptake was analyzed using flow cytometry (Table 2).

Table 2 Cells at a starting density of 50,000 cells/cm² were incubated together with particles for 24 h in the absence or presence of endocytosis inhibitors (100 μ M of Dansylcadaverine (DC) or di-methyl-amiloride (DMA)) at 37 °C. Inhibitors were added 30 min before particle addition; C: Layer-by-Layer coated particle.

Spider silk particles	Model drug	Loading nmol/mg particles	cells with particles / %		
			-	DC	DMA
eADF4(C16)	-	-	17.1 \pm 5.0	9.0 \pm 4.0	8.7 \pm 5.2
	PEI-FI	0.02	36.1 \pm 14.2	7.1 \pm 3.6	15.0 \pm 0.2
	PEI-FI	0.1	12.6 \pm 4.5	12.0 \pm 3.7	4.7 \pm 2.0
	PEI-FI	0.4	54.4 \pm 12.9	36.3 \pm 4.0	26.5 \pm 6.8
eADF4(C16)RGD	-	-	51.4 \pm 11.8	20.4 \pm 10.9	34.3 \pm 8.6
	PEI-FI	0.02	72.8 \pm 4.6	58.8 \pm 4.8	69.4 \pm 7.5
	PEI-FI	0.1	71.7 \pm 3.5	53.1 \pm 6.3	57.1 \pm 11.2
	PEI-FI	0.4	87.7 \pm 3.9	69.6 \pm 2.6	78.6 \pm 2.5
eADF4(C16)R₈G	-	-	69.0 \pm 11.7	23.9 \pm 6.3	63.9 \pm 15.1
	PEI-FI	0.02	5.0 \pm 1.9	2.3 \pm 1.1	3.3 \pm 0.9
	PEI-FI	0.1	10.6 \pm 1.8	5.0 \pm 3.9	5.3 \pm 1.0
	PEI-FI	0.4	18.9 \pm 2.3	15.2 \pm 1.3	9.0 \pm 2.1
eADF4(κ16)	-	-	94.5 \pm 3.2	47.8 \pm 13.0	73.9 \pm 7.5
	FI-ODN	0.02	19.5 \pm 5.0	1.2 \pm 0.3	8.5 \pm 3.8
	FI-ODN	0.1	14.4 \pm 4.1	0.9 \pm 0.1	6.7 \pm 2.7
	FI-ODN	0.4	9.1 \pm 2.6	0.8 \pm 0.2	3.6 \pm 1.1
eADF4(κ16)-C	FI-ODN	0.4	83.4 \pm 3.5	45.1 \pm 13.7	58.4 \pm 1.7

In case of unloaded eADF4(κ 16) particles, the percentage of cells with internalized particles was considerably reduced in the presence of the clathrin-mediated endocytosis inhibitor DC compared to the macropinocytosis inhibitor DMA. By loading eADF4(κ 16) particles with different amounts of FI-ODN, the percentage of eADF4(κ 16) containing cells decreased further in the presence of DC indicating that clathrin-mediated endocytosis plays an important role. Coating of loaded eADF4(κ 16) particles resulted in an uptake efficiency comparable to that of unloaded ones. The role of clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis of coated eADF4(κ 16) particles was also similar to that of unloaded eADF4(κ 16) particles.

As shown previously, the role of both clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis were similar for unloaded eADF4(C16) particles [24], and no significant influence of PEI-FI loading on the uptake mechanism of eADF4(C16) particles could be detected.

eADF4(C16)RGD-0.02, eADF4(C16)RGD-0.1 and eADF4(C16)RGD-0.4 were always taken up by slightly less cells in the presence of DC than in the presence of DMA.

However, the decrease in numbers of cells containing loaded particles in the presence of DC was not as high as reported for unloaded ones. The uptake of unloaded eADF4(C16)R₈G particles occurred mostly by clathrin-mediated endocytosis and only partly by macropinocytosis [24]. The reduction of cells containing loaded eADF4(C16)R₈G particles was similar in the presence of DC and DMA. The results of the identification of the uptake mechanism of loaded eADF4(C16)RGD and eADF4(C16)R₈G particles lead to the conclusion that both uptake mechanisms are likewise important, whereas clathrin-mediated endocytosis plays a more important role in unloaded particle uptake.

Analysis of cell viability was conducted 24 h after addition of loaded and unloaded spider silk particles (using the CellTiter Blue[®] assay) ensuring that the change in uptake efficiencies cannot be ascribed to cytotoxic effects of the particles (Fig. 3). HeLa cells cultured in the presence of loaded or unloaded particles showed normal growth behavior. Thereby, neither the type of the particle, loaded or not, nor the loading concentration seemed to have a cytotoxic effect on HeLa cells.

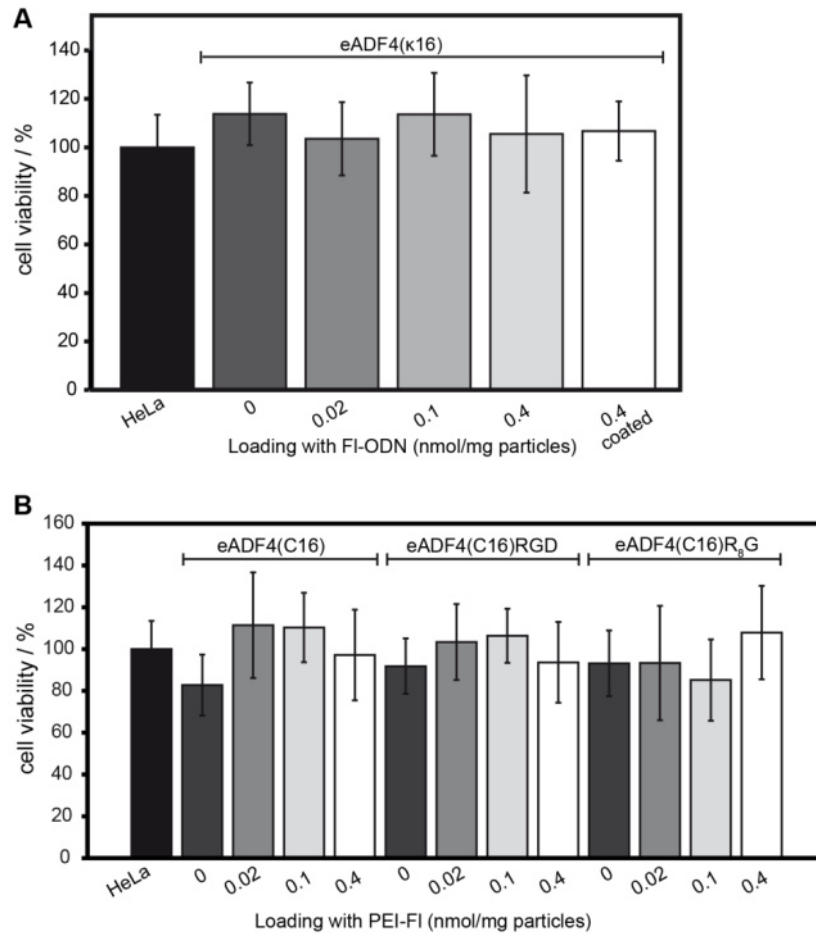


Fig. 3. Viability of HeLa cells incubated in the presence of 9.6 ng/ μ l of eADF4(κ 16) (A) and eADF4(C16), eADF4(C16)RGD or eADF4(C16)R₈G (B) particles after 24 h of incubation. Starting cell densities were 20 000 cells/cm². Spider silk particles were loaded with 0, 0.02, 0.1, and 0.4 nmol of PEI-FI (eADF4(C16), eADF4(C16)RGD, eADF4(C16)R₈G) or FI-ODN (eADF4(κ 16)) per mg of particles. eADF4(κ 16) particles loaded with 0.04 nmol FI-ODN (eADF4(κ 16)-0.4-C) per mg of particles were also coated with an additional layer of eADF4(κ 16) using a layer-by-layer technique.

Release of DNA/Dox upon eADF4(κ 16) particle degradation

The drug doxorubicin (Dox) is often used in cancer therapy and was thus chosen here as a therapeutically relevant model drug to show the properties of spider silk particles as drug carrier systems. eADF4(κ 16) was selected as a suitable silk carrier since it showed the best cellular uptake. Due to its positive charge Dox was first intercalated into plasmid DNA, and the DNA/Dox complex was then loaded onto positively charged eADF4(κ 16) particles (loading efficiency of DNA/Dox was 73.5 ± 30.4 %, while the loading efficiency of Dox was 3.5 ± 0.3 %). Next, release of Dox from DNA/Dox loaded particles was investigated *in vitro*. While in the absence of DNA, Dox was completely washed out of the particles due to charge-charge repulsion of the drug and the positively charged particles (Fig. 4), the release of Dox from DNA/Dox loaded particles was very slow with a maximal release of about 10 % of the initial loading after 24 h of incubation. Since it is

possible that the release of Dox might be triggered by DNA and/or protein degradation *in vivo*, DNaseI, Trypsin or both enzymes were used to analyze the impact of protein and DNA degradation on Dox release.

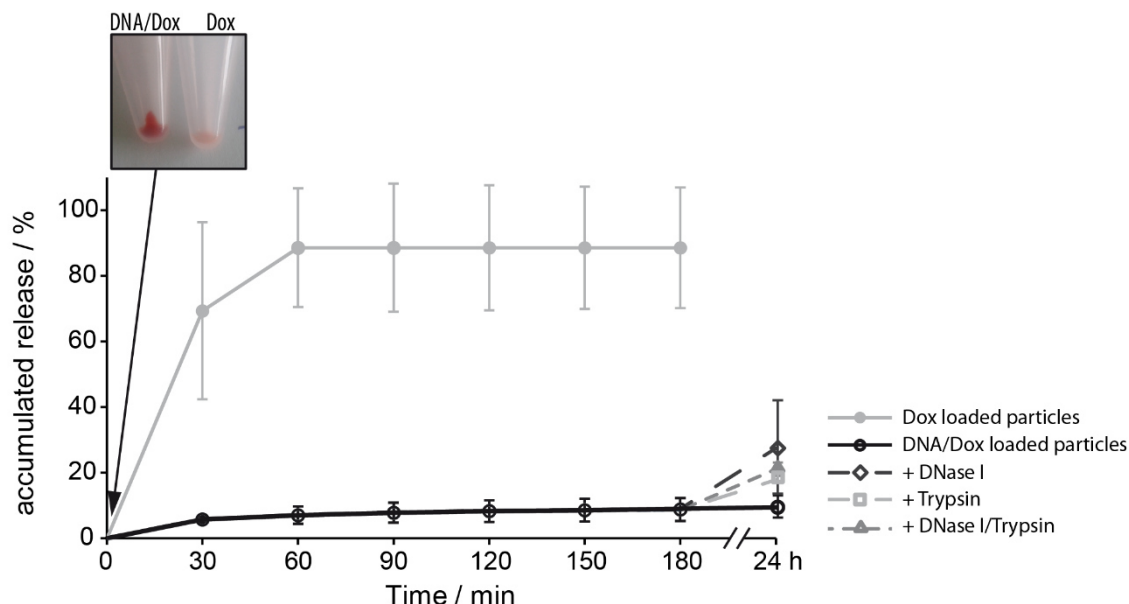


Fig. 4 Release of Dox from DNA/Dox loaded (black circles) or Dox loaded (grey circles) eADF4(κ 16) particles in PBS (pH 7.2) at 37 °C. After 180 min DNase I, Trypsin or both enzymes were added, and the samples were incubated for additional 24 h at 37 °C

Interestingly, both DNaseI as well as Trypsin slightly triggered the release of Dox, but no additive effect could be detected. Within 24 h of incubation up to 27.3 % of the initially loaded Dox could be released in the presence of DNaseI and 18.0 % in the presence of Trypsin, which reflects about double the amount of released Dox as detected in the absence of enzymes.

Cytotoxicity of DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles

The DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles were added to HeLa cells after additional coating with eADF4(κ 16), as described above, and incubated for 6, 24 and 48 h at different spider silk particle concentrations (9.6 ng/ μ l; 48 ng/ μ l; 96 ng/ μ l). As a control, eADF4(κ 16) particles were incubated with doxorubicin in the absence of DNA prior to incubation with HeLa cells. In a further experiment, Dox was added to the media to test for its direct impact on HeLa cells. Upon washing, Dox was released from the spider silk particles in the absence of DNA, but the DNA/Dox complex was retained within the particles. Again, the cytotoxicity was analyzed using the CellTiter Blue[®] assay

(Fig. 5). After 6 h of incubation no effect was detected on the viability of HeLa cells either in the presence of DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles or in the presence of Dox in the media. After 24 h, cell viability decreased to 22 % in the presence of free Dox. Only a slight effect could be detected in the case of DNA/Dox loaded particles at concentrations of 9.6 ng/ μ l, but the effect was identical to that of free Dox at DNA/Dox particle concentrations of 48 ng/ μ l. Interestingly, cell viability was significantly reduced to only 8 % in the presence of 96 ng/ μ l of DNA/Dox loaded particles. After 48 h of incubation, the effect of free Dox and DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles was indistinguishable, and nearly no living cell could be detected. There was no detectable effect of Dox-loaded eADF4(κ 16) particles (without DNA), since Dox was washed out of the particles before internalization of the particles by the cells as stated above. Importantly, eADF4(κ 16) or DNA loaded eADF4(κ 16) particles showed no effect on the viability of HeLa cells.

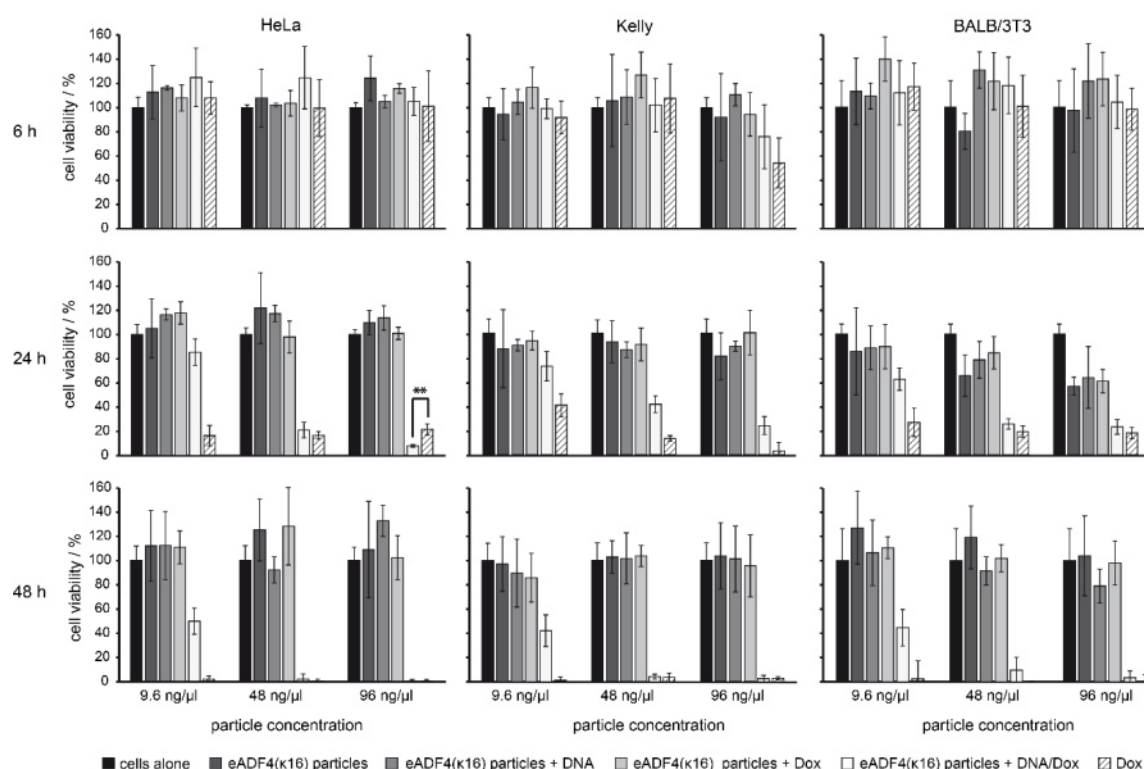


Fig. 5. Cell viability of HeLa, Kelly and BALB/3T3 cells in the presence of eADF4(κ 16) particles loaded with DNA or Dox or loaded with a complex of DNA/Dox. 9.6, 48 or 96 ng/ μ l of particles were added to the cells which were incubated for 6, 24 or 48 h at 37 °C. The Dox concentration in DNA/Dox loaded particles was 2 μ M (9.6 ng/ μ l of particles). In the control experiments with free Dox 2 μ M, 10 μ M and 20 μ M were used, corresponding to the calculated amount of Dox in Dox loaded particles which were added to the cells in concentrations of 9.6 ng/ μ l, 48 ng/ μ l and 96 ng/ μ l. Cell viability was determined using the CellTiter Blue Assay. (** significant difference).

In addition to HeLa cells, the neuroblastoma cell line Kelly was incubated with DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles to analyze a second cancer cell line. As for HeLa cells, no effect on cell viability could be detected at particle concentrations of 9.6 ng/ μ l or 48 ng/ μ l after 6 h of incubation. At 96 ng/ μ l the cells started to respond slightly to DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles as well as to the respective control experiment with free Dox. After 24 h of incubation and at a DNA/Dox particle concentration of 48 ng/ μ l viability decreased further, and the lowest cell viability was detected at a particle concentration of 96 ng/ μ l. However, the effect was not as high as the effect of free Dox at a similar drug concentration, probably due to the fact that Kelly cells uptake less spider silk particles per cell than HeLa cells (data not shown). After 48 h of incubation, the viability of Kelly cells decreased at 9.6 ng/ μ l of DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles and was almost zero at 48 ng/ μ l and 96 ng/ μ l. Here, the effect of DNA/Dox loaded particles on the cell viability was in the same range as for free Dox.

As a final control, the mouse fibroblast BALB/3T3 cell line was incubated in the presence of the particles. The observed effects on fibroblast viability were similar to those on HeLa cells.

4. Conclusion

Spider silk particles have been established as carrier of low molecular weight substances, small proteins or DNA. Further, it has been shown that unloaded spider silk particles can be taken up by cells dependent on the molecular composition of the underlying spider silk protein [21-23, 31]. In this study, it could be demonstrated that the loading of a charged substance influences the cellular uptake of these particles. Loading of polycationic substances on polyanionic eADF4(C16) or eADF4(C16)RGD particles increased the uptake by nearly a factor of two. Surprisingly, the uptake of eADF4(C16)R₈G particles loaded with polycationic substances and that of DNA-loaded eADF4(κ 16) particles was significantly decreased, indicating that the loaded substance has a severe influence on the uptake mechanism in dependence of the spider silk variant used.

It could be further shown that eADF4(κ 16) particles loaded with a DNA/Dox complex can be easily uptaken by HeLa cells and also to a lesser extent by Kelly cells, followed by Dox-related cell death, especially in the case of HeLa cells and BALB/3T3 fibroblasts. In the case of Kelly cells, an effect of Dox could only be detected at high

particle concentrations, and the effect was lower compared to that of free Dox. Hence, HeLa cells were more sensitive to intracellular Dox as shown in the case of 24 h of incubation with DNA/Dox loaded eADF4(κ 16) particles.

Since HeLa cells are known to uptake particles easily, whereas Kelly cells avoid uptake of foreign substances, future experiments have to deal with the improvement of spider silk particles concerning targeted transport of substances to, for example, specific cancerous cell lines. Further investigations are also necessary in terms of intracellular release of DNA from eADF4(κ 16) particles in order to make them viable as transport systems for e.g. gene therapy.

Acknowledgement

We gratefully thank Andreas Schmidt and Johannes Diehl for fermentation of eADF4(C16)RGD, eADF4(C16)R₈G and eADF4(κ 16), Heike Herold for help with the Kelly cell line, Nicolas Helfricht for critical discussions on zeta potential measurements, Eileen Lintz for proof reading, as well as Dr. Martin Humenik for discussions and comments on the manuscript.

References

- [1] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 2004;303:1818-22.
- [2] Grund S, Bauer M, Fischer D. Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends. *Adv Eng Mater*. 2011;13:B61-B87.
- [3] Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem*. 2009;17:2950-62.
- [4] Nitta SK, Numata K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2013;14:1629-54.
- [5] Shelke NB, James R, Laurencin CT, Kumbar SG. Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polym Adv Technol*. 2014;25:448-60.
- [6] Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*. 2012;17:850-60.
- [7] Wohlrab S, Müller S, Schmidt A, Neubauer S, Kessler H, Leal-Egana A, et al. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials*. 2012;33:6650-9.
- [8] Wang FH, Wang Y, Zhang X, Zhang WJ, Guo SR, Jin F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J Control Release*. 2014;174:126-36.
- [9] Humenik M, Smith AM, Scheibel T. Recombinant Spider Silks-Biopolymers with Potential for Future Applications. *Polymers*. 2011;3:640-61.

- [10] Heidebrecht A, Scheibel T. Recombinant production of spider silk proteins. *Adv Appl Microbiol.* 2013;82:115-53.
- [11] Vendrely C, Scheibel T. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular Bioscience.* 2007;7:401-9.
- [12] Huemmerich D, Helsen CW, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R, Scheibel T. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry-Us.* 2004;43:13604-12.
- [13] Slotta U, Tammer M, Kremer F, Koelsch P, Scheibel T. Structural analysis of spider silk films. *Supramol Chem.* 2006;18:465-71.
- [14] Spiess K, Wohlrab S, Scheibel T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter.* 2010;6:4168-74.
- [15] Leal-Egana A, Lang G, Mauerer C, Wickinghoff J, Weber M, Geimer S, et al. Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein. *Adv Eng Mater.* 2012;14:B67-B75.
- [16] Schacht K, Scheibel T. Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules.* 2011;12:2488-95.
- [17] Hermanson KD, Huemmerich D, Scheibel T, Bausch AR. Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Adv Mater.* 2007;19:1810-5.
- [18] Blüm C, Nichtl A, Scheibel T. Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. *Adv Funct Mater.* 2014;24:763-8.
- [19] Slotta UK, Rammensee S, Gorb S, Scheibel T. An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angew Chem Int Ed.* 2008;47:4592-4.
- [20] Lammel A, Schwab M, Slotta U, Winter G, Scheibel T. Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem.* 2008;1:413-6.
- [21] Lammel A, Schwab M, Hofer M, Winter G, Scheibel T. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials.* 2011;32:2233-40.
- [22] Hofer M, Winter G, Myschik J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials.* 2012;33:1554-62.
- [23] Doblhofer E, Scheibel T. Engineering of Recombinant Spider Silk Proteins Allows Defined Uptake and Release of Substances. *J Pharm Sci.* 2015;104:988-94.
- [24] Elsner MB, Herold HM, Muller-Herrmann S, Bargel H, Scheibel T. Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles. *Biomater Sci.* 2015;3:543-51.
- [25] Hunter RJ. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications.* San Diego: Academic Press Inc.; 1981.
- [26] Oh YK, Suh D, Kim JM, Choi HG, Shin K, Ko JJ. Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Ther.* 2002;9:1627-32.
- [27] Ivanov AI. Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? In: Ivanov AI, editor. *Exocytosis and Endocytosis.* Totowa: Humana Press; 2008. p. 15-33.
- [28] Schutze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, et al. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J Biol Chem.* 1999;274:10203-12.
- [29] Davis RJ, Czech MP. Amiloride directly inhibits growth factor receptor tyrosine kinase activity. *J Biol Chem.* 1985;260:2543-51.
- [30] Koivusalo M, Welch C, Hayashi H, Scott CC, Kim M, Alexander T, et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol.* 2010;188:547-63.

[31] Blüm C, Scheibel T. Control of drug loading and release properties of spider silk sub-microparticles. *BioNanoScience*. 2012;2:67-74.

Supplementary Information

Table S 1: Loading efficiency of different protein particles upon incubation with 0.4 nmol of the corresponding model substance FI-ODN or PEI-FI per mg particle

Protein particle	Uptake efficiency FI-ODN / %	Uptake efficiency PEI-FI / %
eADF4(C16)	-	26.6 ± 0.4
eADF4(C16)RGD	-	26.9 ± 0.4
eADF4(C16)R ₈ G	-	23.6 ± 0.3
eADF4(κ 16)	40.6 ± 0.3	-

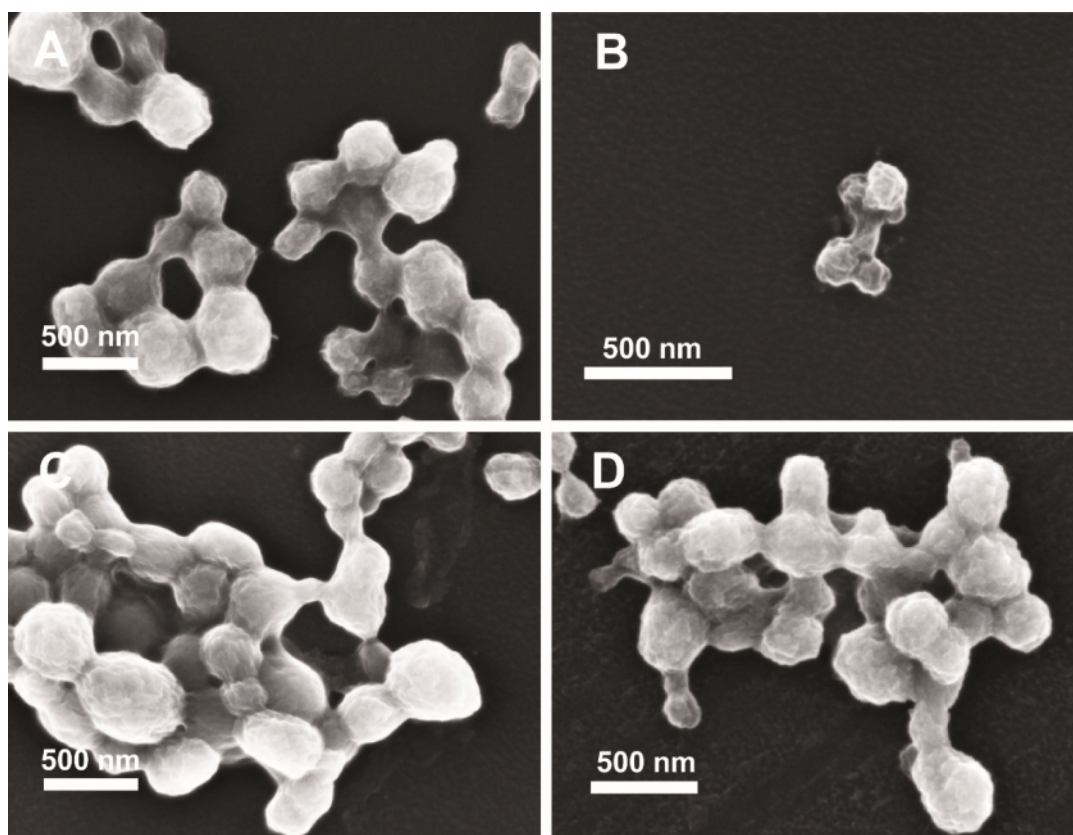


Fig. S 1 SEM Images of spider silk protein particles in dry state, A) eADF4(C16), B) eADF4(C16)R₈G, C) eADF4(C16)RGD, and D) eADF4(κ 16). Particles were produced after resuspending the respective protein in EMiM[acetate] followed by potassium phosphate precipitation. SEM images were taken at an accelerating voltage of 3 kV. Before imaging, the particles were air dried and sputtered with platinum.

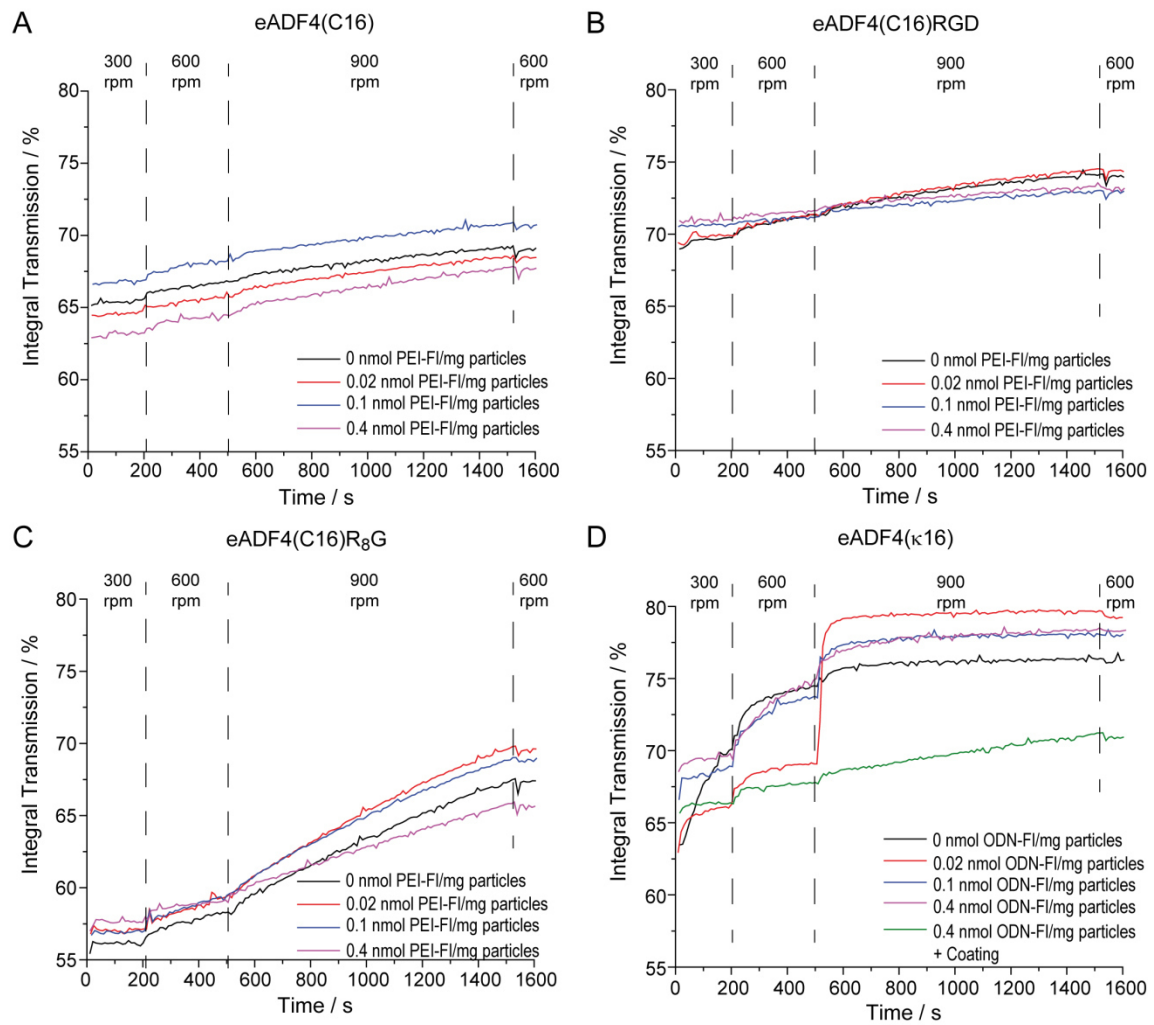


Fig. S 2 Representative sedimentation curves of spider silk and PEI-FI or FI-ODN loaded spider silk particles prepared from a 2 mg ml⁻¹ solution in EMiM[acetate] and analyzed at a concentration of 1.25 mg ml⁻¹, measured at an ionic strength of 12 mM (1/11 PBS) and pH 7.4. The single graphs show (A) eADF4(C16) particles, (B) eADF4(C16)RGD particles, (C) eADF4(C16)R₈G and (D) eADF4(κ16) particles, each in the absence and presence model drug as indicated.

7.3 Teilarbeit III

Die Veröffentlichung der Ergebnisse dieses Kapitels erfolgte in der Zeitschrift *ACS Applied Materials & Interfaces* unter:

“Coatings and films made of silk proteins”

Borkner, C. B., Elsner, M. B. and Scheibel, T.

Reproduziert mit Genehmigung aus *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6, 15611-15625. Alle Copyright Rechte obliegen dem Verlag (2015) *American Chemical Society*.

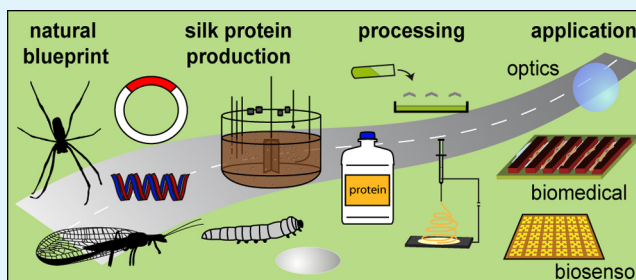
Coatings and Films Made of Silk Proteins

Christian B. Borkner,[†] Martina B. Elsner,[†] and Thomas Scheibel^{*,†,‡,§,||,⊥}

[†]Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, [‡]Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), [§]Institut für Bio-Makromoleküle (bio-mac), ^{||}Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), and [⊥]Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universität Bayreuth, Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth, Germany

ABSTRACT: Silks are a class of proteinaceous materials produced by arthropods for various purposes. Spider dragline silk is known for its outstanding mechanical properties, and it shows high biocompatibility, good biodegradability, and a lack of immunogenicity and allergenicity. The silk produced by the mulberry silkworm *B. mori* has been used as a textile fiber and in medical devices for a long time. Here, recent progress in the processing of different silk materials into highly tailored isotropic and anisotropic coatings for biomedical applications such as tissue engineering, cell adhesion, and implant coatings as well as for optics and biosensors is reviewed.

KEYWORDS: spider silk, silkworm silk, processing, biomedical application, biosensor, optics



1. INTRODUCTION

Silks, like keratins and collagens,^{1–3} are based on a class of structural proteins with highly repetitive amino acid sequences. The proteins are stored in a soluble state and are assembled into solid extracorporeal fibers when sheared or “spun”. Humans have exploited silkworm silk (from *Bombyx mori*) for millennia, primarily for textiles. Silks produced by spiders have also been used for centuries, for example by Polynesians for fishing and by Romans and Greeks as wound dressing and sutures.^{4,5} Because of the outstanding mechanical properties of spider silk compared to other synthetic and natural fibers,^{6–10} their biocompatibility and good biodegradability and lack of immunogenicity and allergenicity, many more technical and biomedical applications are conceivable. Importantly, unlike in nature, spider silk proteins (either regenerated from silk fibers or recombinantly produced) can also be technically processed into nonfibrous morphologies. Here, we highlight recent work on the processing and applications of proteins derived from spider silk (e.g., *Araneus diadematus*, *Nephila clavipes*), mulberry silkworm (*B. mori*), and lacewing silk (e.g., *Chrysopa carnea*, *Mallada signata*, and *Chrysopa flava*) into β -sheet-rich coatings and films.

1.1. β -Crystalline Silks. Almost all arthropods can produce silk, each with a specific structural feature (e.g., helical, coiled-coil, β -sheet, etc.) tailored to specific purposes. This review focuses on β -crystalline silks, which are produced by larvae of mulberry silkworms (*B. mori*), lacewings (*Chrysopidae*), and orb weaving spiders (*Araneae*).

1.1.1. Silkworm Silk. *B. mori* silk has been well characterized, and there exist numerous reviews on its properties^{6,11} and applications.^{12–14} During metamorphosis, silkworms produce silk cocoons for protection. The silk fibers are composed of two silk fibroins (SF), the heavy chain (325 kDa) and the light chain (25 kDa), which are connected by a disulfide bond¹⁵ and

complexed by the small glycoprotein P25 (30 kDa).¹⁶ The proteins have been thoroughly investigated and reviewed.^{17–19} The main structural elements of this material are repeats of the GAGAGS motif, which forms antiparallel β -sheet structures because of intra- and intermolecular hydrogen bonding.²⁰ The fibers are coated with the glue-like glycoprotein sericin, which has to be removed (degumming)^{21–23} prior to processing for use in medical applications because it can cause immunoreactions.^{24–27} It is advantageous that silkworms can be reared in captivity, and the silk can be obtained in great quantities.

1.1.2. Lacewing Silk. To protect their eggs from predators, female lacewings lay their eggs on the ends of silk stalks attached to substrates such as the lower side of leaves. These fibers show unusual bending stiffness based on the structural features of the underlying silk proteins (see also section 1.1.4.).²⁸ The amino acid composition²⁹ and the cross- β -structure³⁰ of egg stalk silk were first described in the 1950s. Fifty years later, researchers from Tara Sutherland's group analyzed the lacewing silk of *M. signata* and identified two proteins: MalXB1 (109 kDa) and MalXB2 (67 kDa). MalXB1 is the main component of egg stalk silk and comprises a serine-, alanine- and glycine-rich tandem repeat.³¹ In another lacewing species (*C. carnea*), at least five individual proteins were identified in the egg stalk silk dope.³²

1.1.3. Spider Silk. Web spinning spiders (*Araneae*) are probably the best-evolved β -crystalline silk producers with the most specialized silk fibers. Female orb-weaving spiders, such as *Nephila clavipes* and the European garden spider *Araneus diadematus*, can produce up to seven different types of silk with task dependent properties.³³ There exist numerous reviews and

Received: February 10, 2014

Accepted: July 8, 2014

Published: July 8, 2014

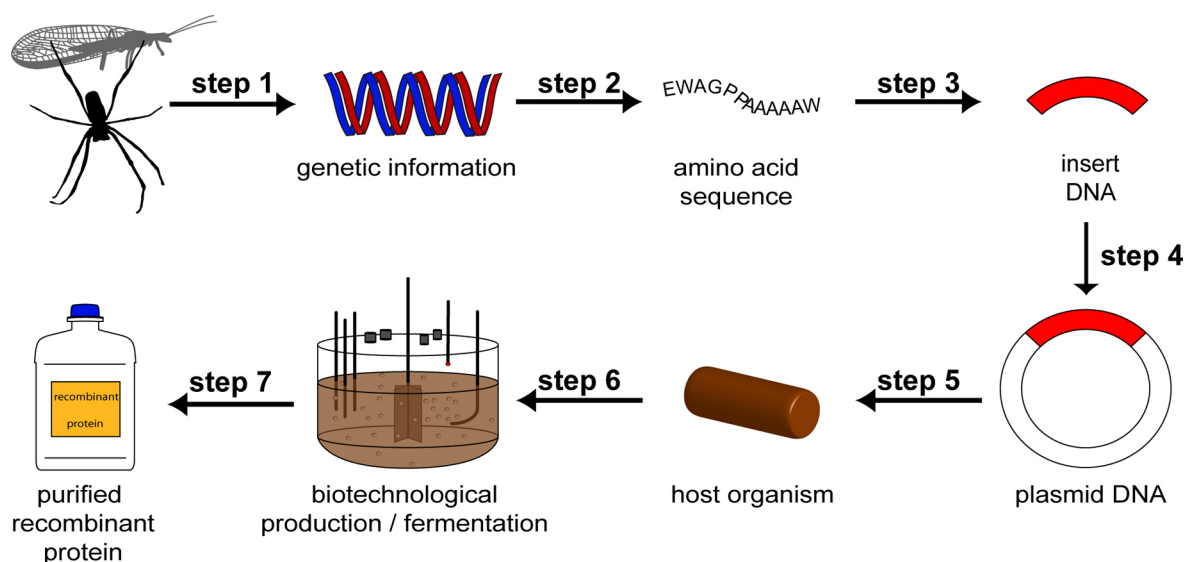


Figure 1. Scheme of recombinant silk production. Step 1, extracting genetic information; step 2, decoding the extracted DNA; step 3, reverse translation and gene engineering; step 4, ligation of insert DNA into the plasmid DNA; step 5, transfer of plasmid into host organism; step 6, fermentation; step 7, purification.

articles summarizing the biology,^{11,34,35} structure^{36,37} and mechanical properties^{6,38–40} of spider silk. Here, we focus on major ampullate (MA) silk, which is produced in the MA gland. This MA silk is used as the outer frame and radii of a spider's web and as its lifeline.⁴¹ MA silk has a very high tensile strength and the highest toughness of all known natural as well as synthetic fibers.^{3,6,38,42–44} MA silk is mainly composed of spidroins (**spider fibroin**) and is divided into two classes (MaSp1 and MaSp2) according to its proline content. MaSp1 has a low proline content and MaSp2 is proline-rich. The physical and related mechanical properties, such as breaking strain, of MA silk are directly influenced by the proline content.⁴⁵ MA spidroins generally contain a repetitive core with individual amino acid motifs repeated up to 100 times accounting for over 90% of the sequences.⁴⁶ The core domain is flanked by nonrepetitive amino- and carboxy-terminal domains, which are highly conserved between different silks and between spider species. These terminal domains mediate the storage and assembly of the spider silk proteins.^{47,48} MA silk fibers are coated with a very thin shell of glycosylated proteins, lipids, minor ampullate spidroins and other proteins.^{49,50} However, these shell compounds are, in contrast to sericin from *B. mori*,⁵¹ not immunogenic, making MA silk an interesting biomaterial for biomedical applications.

1.1.4. Comparison of β -Crystallinity in Silkworm, Lacewing, and Spider MA Silk. The β -sheet content of MA silk (11–46% *N. clavipes*,^{20,52,53} 34–35% *A. diadematus*,⁵⁴ 46% *Nephila edulis*⁵⁵) is similar to that of *B. mori* silk (40–55%).^{20,52} Both silk materials form antiparallel β -sheets aligned along the thread axis. The β -sheets form crystalline-like regions embedded in an amorphous matrix, but also the presence of a so-called interphase was proposed. In contrast to *B. mori* and MA silk, Lacewing egg stalk silk shows an unusual β -sheet structure (content: 20–40%)^{28,32} called cross- β structure, where β -strands are aligned perpendicular to the fiber axis.³⁰ The evidence for two different types of β -sheets in *N. clavipes* MA silk and *B. mori* silk was shown by hydrogen–deuterium exchange experiments. Crystalline β -sheets are D₂O-inaccessible and the β -sheets building the interphase are D₂O-

accessible. The water-accessible interphase consists of weaker hydrogen bonded β -sheets. MA and *B. mori* silk differ in the fraction of the interphase which is significantly higher in case of MA silk ($27 \pm 3\%$) than in *B. mori* silk ($8 \pm 3\%$).⁵³ In the case of *B. mori* silk, crystalline as well as interphase β -sheets are likely formed by GAGAGS motifs. In MA silk, crystalline β -sheets are formed by polyalanine (A_n) regions, and AG and GGA blocks flanking the A_n regions are suggested to be present in β -sheets also.^{52,53} The interphase probably contains GXG (X = Q, Y, L, R) motifs. A three-phase model was postulated where the crystalline regions are flanked by an interphase which is assumed to act as a transition zone between crystalline β -sheets and the surrounding amorphous phase.^{53,56} The structural organization allows to describe the properties of spider silk using a hierarchical model.⁵⁷

1.2. Natural vs Recombinant Silk Production. To exploit the manifold properties of silk, it can be advantageous to investigate the isolated underlying proteins. Silks can be harvested from their natural sources (i.e., for example of *B. mori* cocoons). The silk is degummed by boiling the cocoons in 0.02 M Na₂CO₃, and the degummed fibers are dissolved in strong chaotropic agents (e.g., 9.3 M LiBr), yielding soluble silk fibroins called regenerated silk fibroin (RSF). Because *B. mori* silk has been produced by sericulture (silk farming) for centuries, RSF has been available for investigations for decades.

In contrast, spiders cannot be farmed because they are typically territorial and cannibalistic^{13,47–50} and produce silk of lower quality when held in captivity.^{8,34,58} Although lacewings are bred commercially (they are used as pest control), the quantity of silk produced by each individual is too small for practical applications. In both cases, as an alternative to obtaining silk proteins from natural sources, recombinant strategies for producing silk proteins have been developed, but only a short overview is given here. For more detailed information on natural and synthetic spider silk genes, the reader is referred to Heidebrecht and Scheibel and references therein.⁵⁹ Different approaches for producing silk proteins in different host organisms have failed mainly because of the repetitive character of the gene sequences rich in guanine and

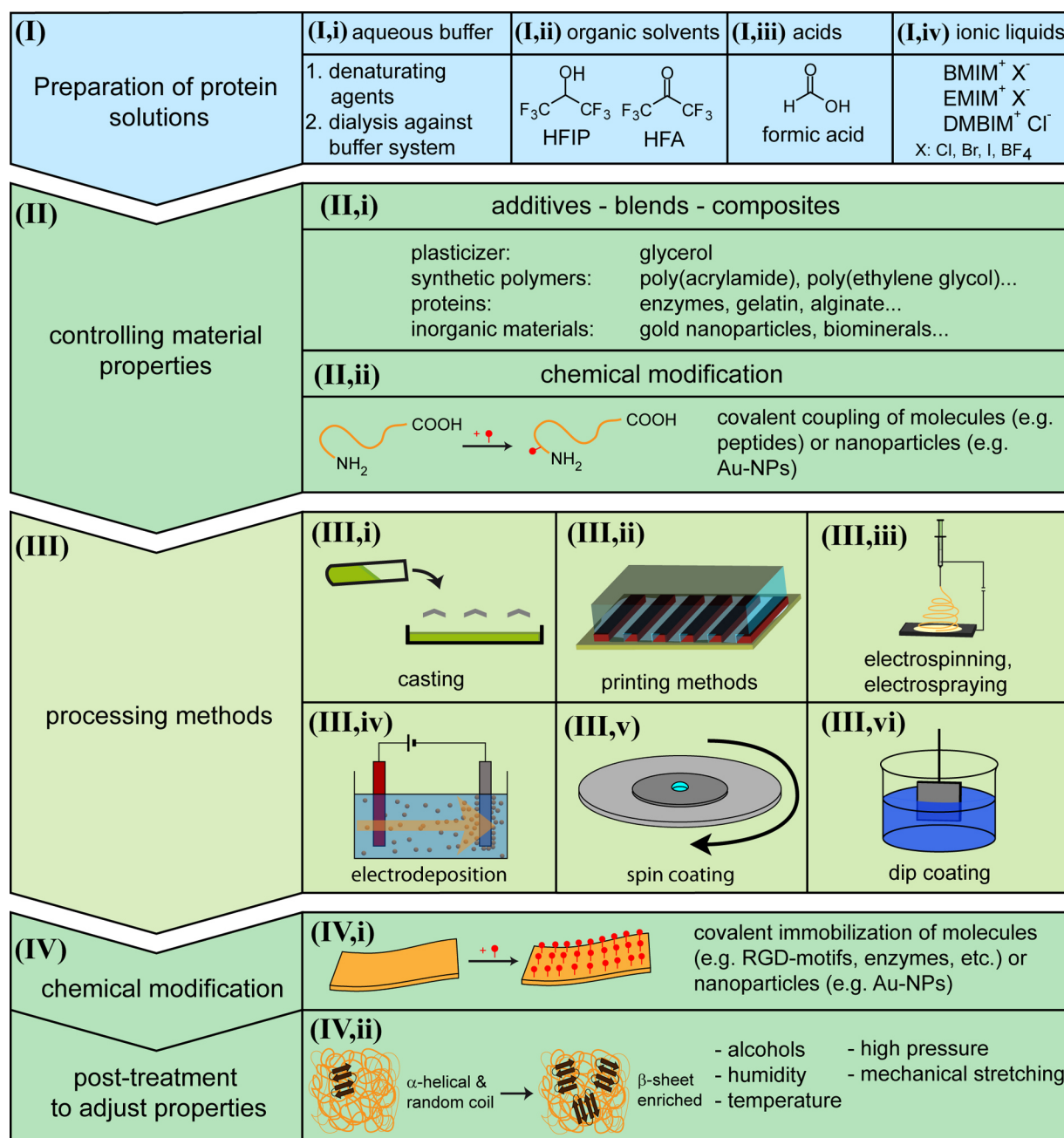


Figure 2. Schematic overview of silk processing. After (I) preparing the silk solutions, the materials properties can be controlled (II) before and (IV) after (III) further processing steps.

cytosine. A successful approach was the construction of synthetic sequences based on natural motifs (Figure 1, step 1–2) and adapting the gene sequences to the codon usage of different host systems like bacteria (e.g., *Escherichia coli*) or yeast (e.g., *Pichia pastoris*) (Figure 1, step 3–5).^{60–63} A similar strategy was performed for a recombinant egg stalk protein (RESP).³² The biotechnological production (Figure 1, step 6) yields silk proteins as primary material for further processing (Figure 1, step 7), but also allows the modification of proteins genetically. Synthetic analogues can be produced with targeted modifications to get desired material characteristics,⁶⁴ giving access to a broad range of applications.

2. PROCESSING OF SILK PROTEINS

The processing of silk proteins includes preparation of silk protein solutions (Figure 2 (I)), controlling materials properties (Figure 2 (II) & (IV)) and processing methods (Figure 2 (III)). Regenerated silk fibroin (RSF), recombinant egg stalk proteins (RESP) and recombinant spider silk proteins (RSSP) can be easily processed into different morphologies like nonwoven mats, films and coatings.

2.1. Preparation of Silk Solutions. At first, silk proteins are dissolved in a denaturing agent to prepare processable silk protein solutions (Figure 2 (I)). Such denaturing agents are chaotropic salts like lithium bromide (LiBr), lithium thiocyanate (LiSCN), guanidinium thiocyanate (GdmSCN), or guanidinium hydrochloride (GdmHCl). Chaotropic salts can easily be exchanged via dialysis (Figure 2 (I,i)). Alternatively,

Table 1. Overview of Synthetic Polymers, Biopolymers and Inorganic Materials for Silk-Based Composite Materials and Blends^a

synthetic polymer		biopolymers		inorganic materials	
nonbiodegradable	biodegradable	proteins	polysaccharides	particles	biominerals
carbon nanotubes	poly(aspartic acid)	collagen	alginate	silver nanoparticles	calcium carbonate
nylon66	poly(ϵ -caprolactone)	enzymes	cellulose	gold nanoparticles	calcium phosphate
polyacrylamide	poly(ϵ -caprolactone-co-D,L-lactide)	fibroins	cellulose xanthate (viscose)	transition metal oxides and sulfides	silica
polyacrylonitrile	poly(carbonate-urethane)	gelatin	chitin		
polyallylamine	poly(lactic-co-glycolic acid)	green fluorescent protein	chitosan		
polyepoxide	poly(lactic acid)	growth factors	hyaluronic acid		
poly(ethylene glycol)	polyurethane	keratin			
polypyrrole		sericin			
polystyrene		spidroins			
poly(vinyl alcohol)					

^aFor details about silk composite materials, the reader is referred to Hardy et al.⁷⁰

silk proteins can be dissolved in fluorinated organic solvents like hexafluoroisopropanol (HFIP) and hexafluoroacetone (HFA) (Figure 2 (I,ii)) or acids like formic acid (FA) (Figure 2 (I,iii)). Also, ionic liquids like 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIM Cl), 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride (EMIM Cl), and 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium chloride (DMBIM Cl) can act as denaturing agents (Figure 2 (I,iv)).^{65,66}

2.2. Additives for Controlling Silk Properties. After preparing the initial silk protein solution, additional substances like plasticizers (e.g., glycerol^{67–69}), polymers or proteins can be added before or during processing the silk materials (Figure 2 (II,i)). A broad range of material blends and composite materials containing silk proteins have been analyzed in the past, including synthetic polymers, biopolymers, and inorganic materials as additives. An overview on additives is given in Table 1. For details concerning composite materials based on silk the reader is referred to Hardy et al.⁷⁰

2.3. Processing Methods of Silk and Silk Blends. Silk proteins and blended silk materials can be processed into films and coatings using various processing techniques (Figure 2 (III)) resulting in different morphologies. Films can be cast or printed e.g. using lithography⁷¹ yielding 2D and 3D structured isotropic or anisotropic micro- or nanopatterned surfaces.⁷² Thin coatings can easily be prepared by dip or spin coating.^{73,74} Using spin coating, the silk proteins can self-assemble due to shear-forces as described for native SF.⁷⁵ Zeplin and co-workers used dip coating to modify the surface of breast implants using RSSP (for details see part 3.1).⁷⁶ Other methods for generating thin silk films are for example the Langmuir–Blodgett (LB) technique⁷⁷ and layer-by-layer (LbL) techniques.⁷⁸

Nonwoven mats represent a completely different type of silk coating which can be produced e.g. by electrospinning^{79,80} out of different solvents.^{81–84} The silk protein solution or material blend is extruded from a syringe, and an electric field between the syringe and the collector plate accelerates the solution and the solvent evaporates. The resulting fibers can be deposited directly on any kind of substrate that is placed on the collector plate. Particles, too, can be deposited on substrates by electrophoretic deposition.^{85–87}

Besides homogeneous films and coatings, materials with gradually changing properties, as found in biological systems

(e.g., mussel byssus), are useful for various applications.⁸⁸ Fibroin/gelatin blends show a wide range of Young's moduli depending on the mixing ratio.^{12,70} Gradient films were cast using glycerol-plasticized gelatin and 0–40% RSF, leading to a gradient material on a centimeter scale with a highly reproducible and smooth mechanical gradient with moduli from 160 to 550 MPa.⁸⁹

2.3.1. Influence of Solvent and Post-Treatment on Silk Film Properties. Films can be cast from different solvents such as aqueous buffers, organic or ionic liquids (Figure 2 (III,i)) and obtained through simple solvent evaporation. The secondary structure of the silk proteins is dependent on the initial solvent and is, therefore, controllable. Fluorinated solvents induce α -helical structure in silk proteins. Films cast out of HFIP show a high amount of α -helical structures (RSF;⁹⁰ RSSP^{91–93}), whereas films cast out of formic acid or water show higher β -sheet content.^{90,94–97} RESP dissolved in HFA also has primarily α -helical structure, and therefore, films cast from these solutions have to be post-treated to yield more stable structures.³² In case of RSSP, the initial solvent has no influence on the thermal stability of films made of a recombinantly produced engineered *A. diadematus* fibroin (eADF4(C16)⁶²), where thermal decomposition starts around 270 °C. In contrast, the initial solvent showed a clear impact on the mechanical properties of the films.⁹⁸

Furthermore, surface hydrophobicity can be controlled by casting conditions as shown in the following experiments with films made of RSSP. eADF4(C16) films with a thickness of 9–11 μ m were cast out of aqueous buffer (10 mM NH₄HCO₃), HFIP, and FA on poly(tetrafluoroethylene) (PTFE; Teflon), polystyrene (PS) and glass at 30% relative humidity and 20 °C. The films showed different surface hydrophobicities depending on the hydrophobicity of the substrate used to cast the films on. After post-treatment with methanol, the surface hydrophobicity was analyzed by contact angle measurements at the film–air interface. Films cast on hydrophilic glass substrates were more hydrophobic at that surface in comparison to films cast on hydrophobic PS and PTFE substrates (Figure 3A). A structural model of microphase separation of silk proteins based on the amphiphilic nature of the silk protein was generated, in which nonhydrophilic polyalanine stretches are arranged into packed β -sheet crystallites causing water exclusion, and hydrophilic

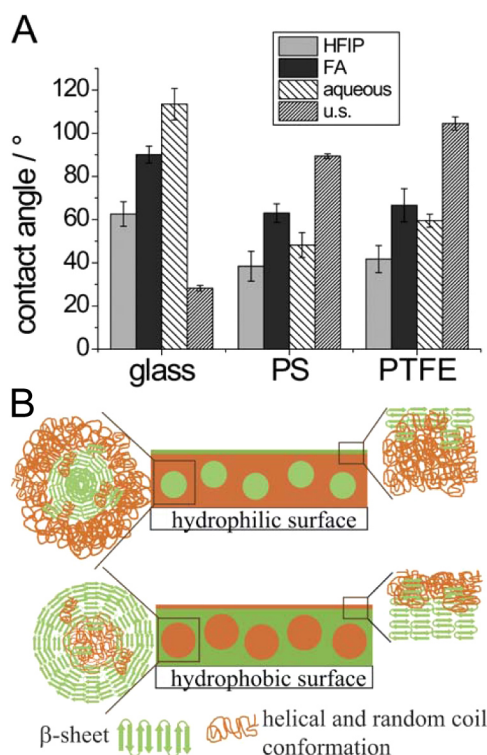


Figure 3. (A) Surface hydrophobicity of eADF4(C16) films dependent on the substrate and the solvent used, determined by water contact angle measurements. Uncoated substrates (u.s.) were measured as reference. (B) Influence of the template on the secondary structure of eADF4(C16). Reproduced with permission from ref 99. Copyright 2012 The Royal Society of Chemistry.

glycine-rich motifs remain in unstructured or helical conformations (Figure 3B).⁹⁹ On hydrophilic templates like glass, hydrophilic silk regions are oriented toward the substrate, and the hydrophobic polyalanine stretches are organized into micellar-like structures or oriented away from the hydrophilic bulk to the silk-air interface, inducing a hydrophobic film surface. On hydrophobic templates, e.g., PTFE, the hydrophobic silk regions are oriented toward the substrate, and the hydrophilic blocks are organized into micellar-like structures or oriented away from the hydrophobic bulk to the silk-air interface.⁹⁹ Microphase separation is a common effect of block copolymers, and RSF can also be described as multiblock polymer composed of crystallizable and uncrystallizable blocks. β -sheet crystallization is therefore spatially limited by microphase separation of the two different blocks.¹⁰⁰ Furthermore, Cebe et al. performed fast scanning chip calorimetry with RSF and reported the first reversible melting of β -sheet crystals similar to the behavior of lamellar crystals composed of synthetic polymers.¹⁰¹

In the case of RSF, Lawrence and co-workers demonstrated the influence of RSF film hydration on material properties depending on the processing technique. Methanol treated RSF films showed a less-ordered secondary structure arrangement than water annealed RSF films. The methanol treated films had a higher water absorbing capacity and reached higher oxygen permeability rates.¹⁰²

2.3.2. Processing Techniques for Adopting Different Surface Topographies. It is possible to produce structured micro- and nanopatterned silk protein surfaces by common micro- and nanopatterning methods. For example, RSF

microstructures have been assembled by rapid transfer-based micropatterning and dry etching¹⁰³ and RSSP microstructures by solvent-assisted microcontact molding and capillary transfer lithography.¹⁰⁴ Micropatterned films made of RSF were cast on poly(dimethylsiloxane) PDMS replica molds to transfer surface structures of patterned surfaces to silk films,^{105,106} and micropatterned films made of RSSP and RESP have also been processed for controllable cell adhesion, cell growth and cell orientation (for details, see section 3.1.1).⁹ The RSSP/RESP patterns were made using photolithographically produced silicon templates to generate a microstructured PDMS negative which was placed on a smooth cast silk protein film (RSSP or RESP). Then, the second silk solution was soaked into the molds by capillary forces. After evaporation of the solvent, the PDMS stamp was removed yielding a patterned silk film.⁹

2.3.3. Influencing Silk Film Properties Using Chemical Modifications. Various coupling reactions can be used for chemical modification (Figure 2 (II,ii) & (IV,i)) of silk proteins depending on their amino acid composition i.e. the number and type of functional groups. In the case of *B. mori* SF, the most abundant reactive amino acid residues of the heavy chain are threonine, serine, tyrosine, aspartic acid and glutamic acid. Common coupling reactions used for chemical modification of these amino acids are cyanuric chloride-activated coupling, carbodiimide coupling, and reaction with glutaraldehyde. Further, amino acids can be modified by arginine masking and sulfation and azo-modification of tyrosine. For details about these chemical modifications the reader is referred to Murphy and Kaplan and references therein.¹⁰⁷

Huemmerich and co-workers modified films made of the RSSP eADF4(C16) by carbodiimide activation of the carboxy groups of glutamate residues and the carboxy-terminus (overall 17 reactive sites) for reaction with amines in solution. The coupling of fluorophores and of the enzyme β -galactosidase was successfully shown with RSSP.⁹² For biomedical applications cell binding properties can be influenced by cell binding peptides like RGD-motifs which were coupled by thiol chemistry to RSSP (eADF4(C16)) films and by carbodiimide coupling to RSF films to improve cell adhesion (see section 3.1.1).^{107,108} In the case of RSSPs, like eADF4(C16) which do not have cysteine residues in their sequence, the protein can be genetically modified during production (see chapter 1.2), for example, with a cysteine-containing tag at the amino-terminus. The eADF4(C16)^{ntagCys}-film surfaces expose the thiol groups of the cysteines, allowing controlled and specific modification with reagents containing a maleimido function.⁷⁴ Maleimido-fluorescein, biotin maleimide, RGD-motifs, β -galactosidase and monomaleimido-nanogold ($d = 1.4$ nm) could be successfully coupled to the silk film surface.⁷⁴ It was also possible to covalently attach sulfonic acid groups to tyrosine of RSF using diazonium coupling. The negatively charged and hydrophilic sulfonic acid groups can selectively promote pyrrole adsorption to sulfonic acid modified RSF films, yielding conductive polypyrrole patterns on silk surfaces by printing or stamping inks made of sulfonic acid-modified RSF on RSF films. Pyrrole adheres selectively to the acid modified RSF and sets up conductive structures out of polypyrrole after polymerization.¹⁰⁹

2.4. Post-Treatment. Post-treatment of processed silk proteins (Figure 2 (IV,ii)) can be used to increase the β -sheet content of a silk material resulting in more stable and water insoluble protein materials.^{80,110,111} The structural change from

α -helical and random coil structures to β -sheets and can be induced by temperature,¹¹² alcohols (e.g., methanol, ethanol, 2-propanol),^{92,93,95,111} humidity and water vapor,¹¹³ high pressure,¹¹⁴ mechanical stretching,¹¹⁵ and cosmotropic salt solutions (e.g., 1 M potassium phosphate).^{93,116} Anisotropic materials can also be produced by post-treatment leading to alignment of the underlying structural elements. Both types of processing influence the mechanical properties of the resulting materials.^{13,20,117}

3. APPLICATIONS OF SILK FILMS, COATINGS, AND NONWOVEN MATS

3.1. Tissue Engineering and Medical Applications. Silk shows interesting features such as biodegradability and biocompatibility (reviewed in Leal-Egaña and

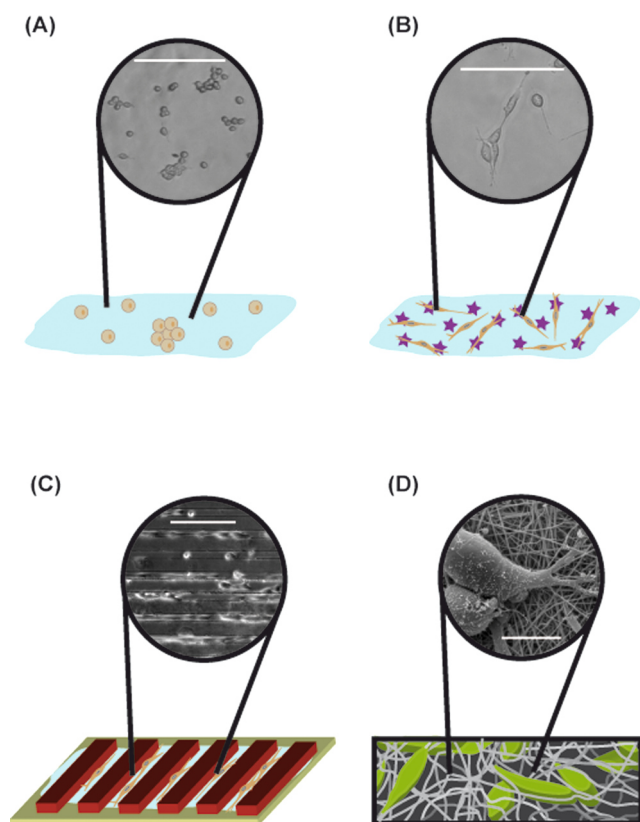


Figure 4. Cell adhesion on different silk morphologies and on modified silk films. (A) Cells were seeded on flat RSSP (eADF4(C16)) films cast from HFIP). Low cell adhesion and round-shaped cell morphologies of BALB/3T3 fibroblasts are detected. (B) RGD-modified eADF4(C16) films show improved cell adhesion and cell spreading. The surface topography can be altered (C) with patterning or (D) by creating nonwoven meshes. Both approaches have a large impact on cell adhesion and orientation.^{9,106,120,139,146,151,152} Scale bars: (A–C) 200 μm ; (D) 10 μm .

Scheibel¹⁴),^{118,119} and nothing has been reported concerning allergies against pure silk materials, probably based on low or no inflammatory responses when in contact with animals and humans.¹¹⁹ Nonwoven mats have been applied as wound dressings, coatings, or scaffolds,^{120,121} and silk films have been investigated as coatings and wound dressings as well as drug delivery systems.¹²²

B. mori silk has been reported to cause allergic reactions and immune responses when using so-called “virgin silk” (silk

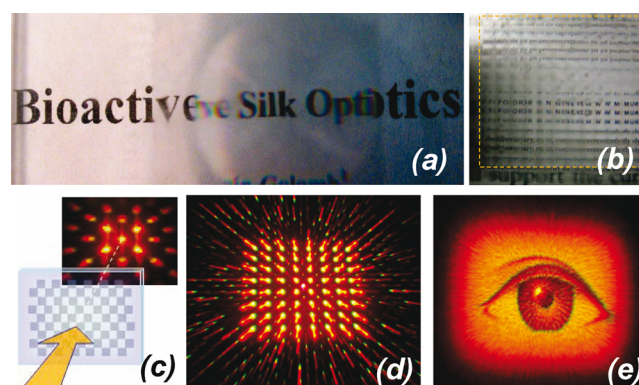


Figure 5. Optical elements made of silk. (a) silk lens, (b) 12 \times 12 silk lens array, (c) scheme showing the approach for generating images, (d, e) different projected patterns obtained from propagation of a white light laser source through 2D, 64 phase level diffraction patterns. The images are taken in the far field at a distance of 10 cm from the silk optical element. (Masters from Digital Optics Inc., Tessera Corporation). Reproduced with permission from ref 168. Copyright 2008 American Chemical Society.

directly obtained from the silkworm), whereas removing sericin from the silk fibers (i.e., degumming) yields a material that causes no allergic reaction and/or immune response.^{24–27,123–127} MA spider silk is not coated with glue, therefore, MA silk causes no allergic reactions/immune response like virgin silk. In the case of lacewing egg stalk silk, it is currently not known if it causes allergic reactions and/or immune responses because not all the proteins have been identified and tested yet.

The properties of silk films (hydrophobicity, water-contact-angle, secondary structure, etc.) differ because of the protein used, the solvent, template surface, post-treatment, and film thickness as mentioned above,^{98,99,113,128,129} with dramatic impact on cell organization, adhesion, and proliferation when used as a scaffold. Cell interactions with surfaces or other cells are mainly mediated by the integrin protein family.¹³⁰ Binding motifs recognized by integrins are present in proteins of the extracellular matrix (ECM) (e.g., laminin, collagen, fibronectin).^{130–132} Therefore, it is also of great importance how such ECM proteins interact with a “technical” surface (such as in silk scaffolds). Below we will give an overview of general aspects of cell–silk surface interactions followed by a more detailed description of recent results (from the last 10 years) concerning putative medical applications of silk scaffolds.

3.1.1. Cell–silk Surface Interactions and Silk Surface Modifications for Improved Cell Binding. Generally, weak cell attachment has been detected on RSF, RSSP, and RESP films (Figure 4A), such as for osteoblast-like cells SaOs-2 on RSF¹³³ or BALB/3T3 fibroblasts on eADF4(C16) RSSP and RESP films.^{9,108,120} Cells on these silk films are round and form cell aggregates (i.e., cell–cell interactions instead of cell–matrix interactions).^{108,120,134} SaOs-2 cells up-regulated the production of ECM proteins (100%) such as collagen type *I- α* or alkaline phosphatase on RSF films, whereas fibroblasts up-regulated collagen-I on RSSP (eADF4(C16)) films as a result of weak attachment.^{120,135} Weak cell attachment can be partly explained by the absence of cell recognition motifs.¹³⁶ Furthermore, RSF and RSSP (eADF4(C16)) are negatively charged proteins under cell culture conditions, which is also not conducive for cell attachment because cell surfaces are also negatively charged.^{137,138} In contrast, films made of the

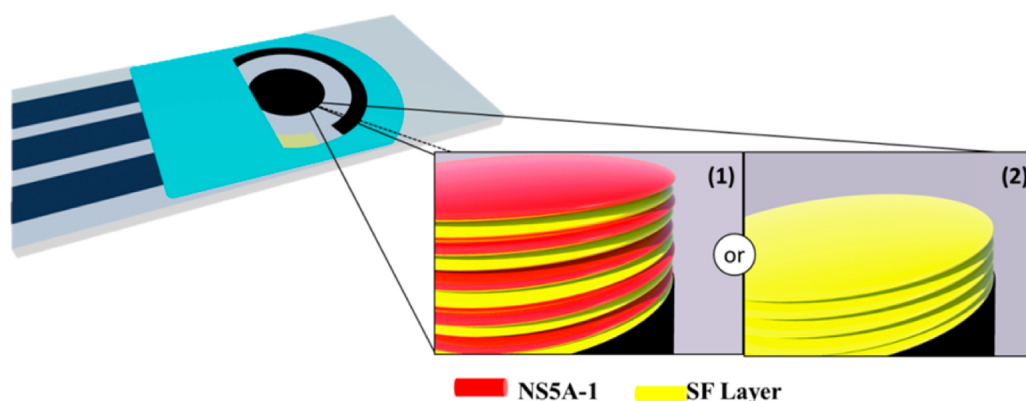


Figure 6. Schematic representation of five-layer LbL film of SF/NSSA-1 (1) and RSF (2) assembled onto carbon screen-printed electrodes. Reproduced with permission from ref 176.

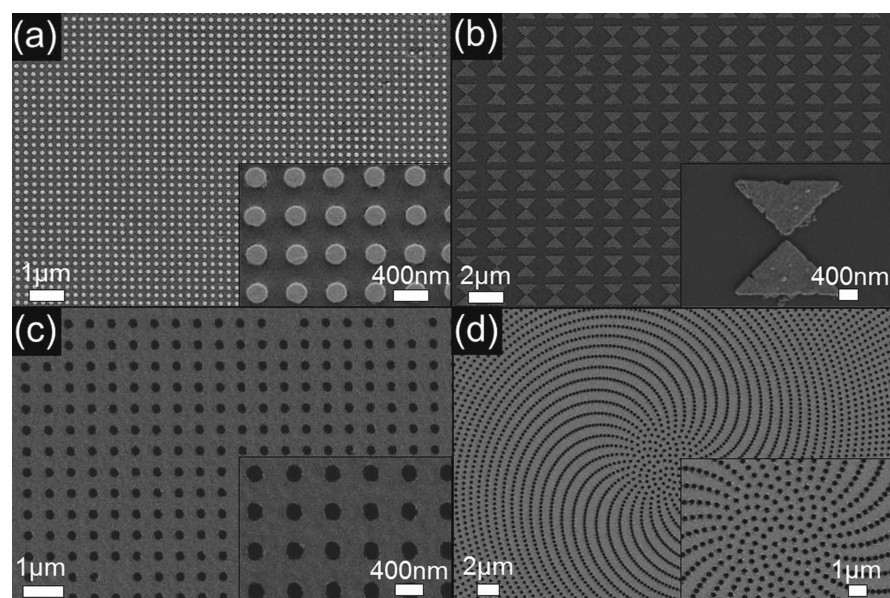


Figure 7. SEM images of transfer imprinted plasmonic nanodot arrays on doped silk fibroin films: (a) Periodic pattern of $a = 400$ nm and (b) bow tie structures with gaps of 40 nm. SEM images of transfer imprinted plasmonic nanohole arrays on doped silk fibroin films: (c) Periodic pattern of $a = 600$ nm and (d) α_2 spiral array with $a_{\text{ave}} = 308$ nm. Reproduced with permission from ref 182. Copyright 2012 Wiley–VCH.

positively charged RSSP (4RepCT) allowed cell attachment similar to control plates.¹³⁹ But on RESP (N[AS]₈C) films, also consisting of a positively charged protein, cell adhesion is quite low and the few cells detected on these films show a round morphology.⁹

One strategy to improve poor cell–silk surface interactions is to modify silk surfaces with recognition motifs (i.e., peptides) like the integrin binding motif RGD from fibronectin (Figure 4B).^{22,108,133,140,141} Silk proteins can be modified genetically (in case of recombinant versions) or coupled chemically in all cases with RGD motifs. Here, a few examples will highlight the usability of such experimental set-ups. RGD-modified silk surfaces showed improved cell adhesion properties, and this effect could be detected for films made of negatively as well as for positively charged silk proteins.^{108,142} In this context, researchers have created different blended RSF films with a synthetic RGD-containing spidroin for the analysis of osteoblastic differentiation,¹⁴³ analyzing the adhesion, proliferation and differentiation of an osteoblast precursor cell line (MC3T3-E1) on blended films (different RGD content accompanied by a different crystallinity). Increased crystallinity

stabilizes the film and results in increased numbers of adherent cells, but no dependency of cellular differentiation was noted due to the β -sheet content. A ratio of 90:10 RSF to RGD-spidroin was optimal for the increased film stability and cell attachment. Another strategy to improve cell binding can be the coupling of macromolecules from the ECM (e.g., glycopolymers) to silk films.^{144,145} RSSP films (e.g., eADF4(C16)) modified this way showed improved cell adhesion, and the morphology of the cells changed from round (unmodified films) to spread (modified films).¹⁴⁴

Other peptides can be also suitable for increasing cell interactions with scaffolds and can lead to bone regeneration. Foo et al.¹⁴⁶ for example, modified the surface of RSSP 15mer films and electrospun fibers (nonwoven meshes) with the cell recognition motif RGD or a R5 peptide (a silicification inducing domain), which could be beneficial in the field of bone regeneration. Silicification could be only detected in the presence of the R5 peptide. Mieszawska and co-workers^{152,153} were interested in silk-silica composite films and the behavior of human mesenchymal stem cells (hMSCs) seeded thereon. The RSF solution and silica solution (containing silica particles of

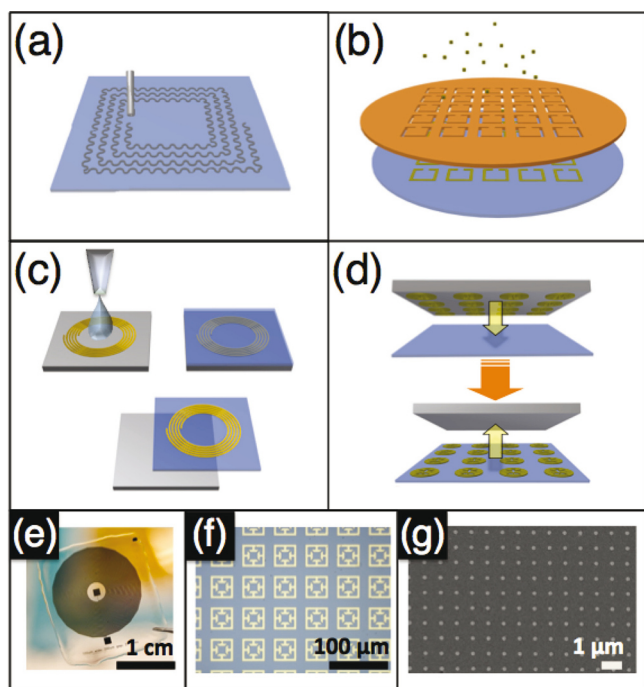


Figure 8. Schematics of fabrication processes for passive silk sensors. (a) Inkjet printing of functional components directly on the silk substrate. (b) Shadow-mask transfer. (c) Casting-lift-off process. Functional components are fabricated directly on silanized silicon wafers. Silk is cast directly onto the silicon substrate, and the functional components are transferred onto the silk surface after drying under ambient conditions. (d) Direct transfer. Functionalized surfaces are applied to the silk substrate along with heat and pressure. Removal of the original substrate leaves the functional components on the surface of the silk substrate. (e) Example of a GHz resonant coil on silk, fabricated using the silk transfer applied micropatterning process (STAMP). (f) THz resonant silk metamaterial array, fabricated via shadow mask deposition. (g) Au nanoparticle array on silk, fabricated using direct transfer. Reproduced with permission from ref 184. Copyright 2012 Wiley–VCH.

24 nm, 500 nm, or 2 μm in diameter) were cast together on a cell culture plate and post-treated with methanol, yielding good proliferation rates of hMSCs as well as high cell densities. Osteogenic markers were up-regulated, and an increased formation of collagen/calcium phosphate was detected in the ECM, indicating osteoinductive properties of RSF/silica films.^{147,148}

Cell attachment and proliferation, the polarity, morphology and cytoskeleton reorganization of bound cells, can be influenced by cell recognition motifs and the topography of a silk film's surface.^{149,150} On flat films made of RSSP (eADF4(C16)) or RESP (N[AS]₈C), BALB/3T3 fibroblast adhesion was very weak.^{9,108} BALB/3T3 fibroblasts as well as C2C12 myoblasts seeded on patterned films of eADF4(C16)/N[AS]₈C, with eADF4(C16) being the bottom layer, adhered in the grooves and proliferated better than on films of each individual protein. The cells aligned within the grooves and myoblasts even started to form myotubes, which is an important first step toward skeletal muscle regeneration (Figure 4C). Surprisingly, RGD-modified RSSP (eADF4(C16)) films as a ground layer did not result in significantly increased cell binding.⁹

An alternative to changing surface topography of silk films is the production of silk nonwoven meshes as a coating of

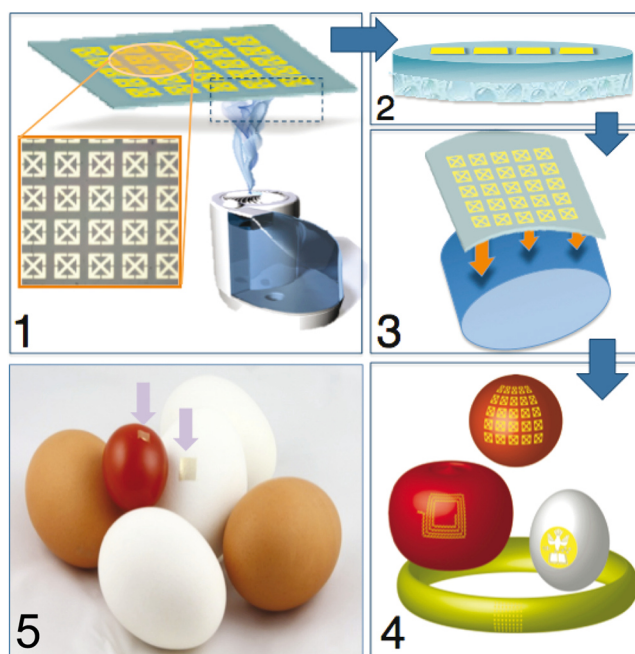


Figure 9. Rapid transfer of silk antennas onto curved substrates. (1) Water vapor is applied to the back of noncrystalline functionalized silk films, yielding (2) a functionalized film of which the back surface of the film has been partially molten. (3) The quasi-molten surface is conformally applied to arbitrary surfaces, yielding (4, 5) functional sensors thereon. Reproduced with permission from ref 184. Copyright 2012 Wiley–VCH.

substrates (Figure 4D). Nonwoven meshes with fiber diameters of 10–70 μm of RSSP (4RepCT) did not show improved cell adhesion and proliferation compared to smooth films.¹³⁹ However, hybrid matrices made of a bottom film layer on which a nonwoven mesh (diameter of fibers: 10–70 μm) was applied showed improved cell adhesion compared to smooth films or nonwoven meshes alone.¹³⁹ Cells like the vascular cell line HAECs or HCASMCs as well as endothelial cell line PIEC grew better on RSF nonwoven meshes (fiber diameter: 1016 nm¹⁵¹ and 377 nm \pm 77 nm¹⁵²) than on smooth RSF films.^{151,152} Similar results were obtained by seeding BALB/3T3 fibroblasts on RSSP (eADF4(C16)) nonwoven meshes.¹²⁰ Nonwoven meshes with different fiber diameters (between 150 and 680 nm) were produced, and fibroblasts seeded thereon. The adhesion and proliferation rate of the cells increased with increasing fiber diameter likely due to the relation of cytoskeleton organization and space between the fibers of the mesh.

Patterned RSF films of different widths and depths were also used to orient mesenchymal stem cells (MSC) for compact bone regeneration.¹⁰⁶ One pattern in particular (3500 nm width/500 nm depth) induced osteogenic differentiation, a robust cell alignment and also ECM production similar to native cortical bone.

Neural stem cells were also cultured on films made of the positively charged RSSP (4RepCT). Cell adhesion and proliferation was comparable to the positive control (cell culture plates specifically treated for nerve cell cultivation).¹⁵³ Patterned films of negatively charged RSF with electrodes incorporated for axon alignment and outgrowth stimulation yielded varying results.¹⁵⁴ Stimulating the cells and monitoring over 3–5 days showed that the neural stem cells (P19) were

growing, orientating along the grooves, and their axons aligned and grew out. However, after several days, the cells started to detach from the RSF surfaces. Not only RSF films but also fibers were used for nerve regeneration, which are not discussed further here. However, RSF fibers with a quite small diameter (400 nm) are more favorable to the development and maturation of neurons.¹⁰⁵

3.1.2. Implants Made of or Coated with Silk. Animals with implants coated with silk generally show low levels of inflammation markers like cytokines.^{76,119,155} Zeplin and co-workers coated silicone breast implants with RSSP with the aim of reducing the risk of capsular fibrosis.⁷⁶ Fibroblasts, which are critically involved in fibrosis, show decreased proliferation rates on spider silk coated silicone implants in comparison to uncoated ones. Primary human monocytes involved in fibrosis showed a significantly reduced differentiation into CD68-positive macrophages (histiocytes). Upon implantation into subcutaneous pockets of Sprague-Dawley rats, the coated implants were well-tolerated, and no wound healing disorders were detectable. Importantly, no liver granulomas and alterations of lymph nodes were detected, excluding the presence of infections or epitopic inflammation. After explantation, histological examinations of the uncoated implants showed periprosthetic tissue rich in fibroblasts and histiocytes organized in multiple cell layers, whereas silk-coated implants were surrounded by significantly fewer cells organized in only two layers. Additionally, the expression levels of several other fibrosis/inflammatory markers were significantly reduced.

For specific biomedical applications, enzymes and proteins can be coupled to silk films. Several specific proteins can be used for bone or dentin regeneration and some selected examples are explained in detail. The bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) stimulates osteogenesis and was covalently bound to RSF films. BMP-2 silk films were more efficient in inducing osteogenic differentiation of bMSCs (bone mesenchymal stem cells) than free BMP-2 or a control silk film without BMP-2.¹⁵⁶ The dentin matrix protein 1 (DMP-1) is involved in nucleation and orients crystallization of hydroxyapatite within teeth, which is a prerequisite for their remarkable toughness and hardness.¹⁵⁷ Recently, RSSP/DMP-1 hybrids were analyzed versus plain RSSP films concerning biomineralization, i.e., the growth of hydroxyapatite crystals on the film surfaces. Films containing the DMP-1 protein were biomineralized, whereas films without DMP-1 did not induce biomineralization. Biomineralized RSF scaffolds were also used as bone grafts to repair canine inferior mandibular border defects.¹⁵⁸ The combination of bMSCs and apatite silk scaffolds led to fully repaired mandible defects in large animals, whereas the scaffold or bMSC alone showed incomplete bone repair 6 months after implantation. Furthermore, RSF can be processed directly into bone screws for fixation devices.¹⁵⁹ For better bone ingrowth into these implants or healing regulation, the RSF screws could be easily modified with BMP-2 protein or antibiotics to prevent infections.

For peripheral nerve repair Gu and co-workers fabricated a chitosan/RSF based scaffold.⁵⁵ For creation of a Schwann cell (SCs)-derived coating they were seeded on RSF/chitosan conduits for 14 days. By implanting the SC-derived ECM chitosan/RSF scaffold into rats the scaffold supported axonal outgrowth at an early regenerative stage and nerve regeneration. Although the new composite scaffold was not better than the acellular scaffold, it provided several advantages like pathogen-free production.

For application of silk scaffolds or coatings of implants in vivo, sometimes antibiotics or an antibacterial surface are required. Therefore, silver ions, known to be antimicrobial, were bound through a silver binding peptide to RSSP to yield antimicrobial silk surfaces.¹⁶⁰ In another series of experiments, antibiotics were loaded into RSF films which were incubated with *E. coli* and *Staphylococcus aureus*.¹⁶¹ The antibiotic-loaded RSF films suppressed bacterial growth completely. RSSP films coupled with antimicrobial peptides also showed antimicrobial properties in tests with *E. coli* and *S. aureus*, whereas the simultaneously tested cell line (SaOs-2) was not affected.¹⁶²

3.2. Silk Optics and Biosensors. Silk films and coatings can also be used in optical devices or biosensors and various applications mainly using *B. mori* fibroin have been reported, and some of them are highlighted herein. The oxygen permeability of RSF membranes is similar to that of hydrogel membranes which are used for soft contact lenses. Due to its biocompatibility, optical properties (e.g., high transparency) and oxygen permeability, RSF membranes are applicable as contact lens material.^{163–165} Silk materials can also be processed into morphologies (e.g., by nanoimprinting, casting, spinning) useful in optical, photonic, electronic, and optoelectronic applications.¹⁶⁶ By nano- and micropatterning of optically transparent biocompatible RSF films, 3D diffraction patterns with a high fidelity were obtained.¹⁶⁷ Lawrence and co-workers used RSF to produce highly tailored structures and morphologies for optical devices (Figure 5).¹⁶⁸

Curved rodlike optical waveguides have been produced by direct ink writing using RSF “ink” containing 28–38% RSF, followed by methanol post-treatment showing controlled structure and composition.¹⁶⁹ Photoactivation of drugs in silk structures is also possible, because silk biomaterials provide a perfect matrix for stabilizing enzymes because of their thermal, chemical, and mechanical robustness. Different approaches for immobilizing enzymes in silk protein materials were successful, conserving enzyme activity over months to years e.g. for their use in biosensors.^{170–172} Lu and co-workers blended glucose oxidase (GOx), horseradish peroxidase (HRP) or lipase with RSF and cast the blended material into films.¹⁷³ Demura¹⁷¹ and Asakura and co-workers¹⁷⁴ immobilized glucose oxidase (GOx) for biosensing of glucose. HRP or lipase immobilized in RSF films were used for the determination of hydrogen peroxide and uric acid in a flow injection system.¹⁷³ Tao and co-workers used a microstructured multifunctional RSF optical element for simultaneous drug delivery and feedback response.¹⁷⁵

Antigens as disease detecting biosensors were also immobilized on RSF membranes.^{176,177} The peptide NSSA-1 (PPLLESWKDPDYVPPWHG) derived from the hepatitis C virus (HCV) was immobilized on RSF films coating carbon screen-printed electrodes using a layer-by-layer technique (Figure 6).¹⁷⁶ Although plain RSF films showed no significant response, the immunosensor made of SF/NSSA-1 LbL-films showed a signal in presence of the anti-HCV (1 $\mu\text{g/mL}$), thus establishing a highly sensitive immunosensor.¹⁷⁶

Other types of sustainable sensors made of silk are photonic crystals.^{178,179} Three-dimensional photonic crystals were fabricated by pouring RSF solution over a mask of a close packed self-assembled colloidal crystal of poly(methyl methacrylate) (PMMA) spheres. After a drying step, PMMA is dissolved and the silk inverse opal (SIO) is obtained. The color can be controlled by changing the size of the PMMA spheres and by filling the voids with liquids like acetone. Because of their intrinsic structural color and biocompatibility, these silk

materials are suitable for microscale implantable biosensing and targeted therapeutics.^{178,179} Further work generated silk-protein based hybrid photonic-plasmonic crystals (HPPC), incorporating a 3D SIO and a 2D plasmonic crystal formed on top of the SIO to combine the properties of these two structures (2D SIO & 3D pseudophotonic band gap) making it suitable as a multispectral refractive index sensor.¹⁸⁰ Diao et al. produced SIOs with bistructural colors at UV and visible, UV and IR, and visible and IR wavelengths. The SIOs showed a linear relation between humidity and the wavelength of the reflected light, which gives rise to optical humidity sensors.¹⁸¹

Lin and co-workers demonstrated a direct transfer of subwavelength plasmonic nanostructures on bioactive RSF films, overcoming problems of integrating plasmonic metallic nanostructures into biopolymeric ones.¹⁸² A direct transfer nanofabrication technique (based on nanotransfer printing) was used for the fabrication of large-scale metallic nanoparticles (plasmonic nanodots) and perforated metallic films (plasmonic nanoholes) on RSF films, obtaining a high fidelity sequential transfer of plasmonic nanoparticles, optical bow tie nano-antennas, and nanohole arrays with periodic and nonperiodic geometries, preserving the functionality of the imprinted biopolymer. Some examples of the structures obtained are shown in Figure 7.

Silk films also can be used to produce curvilinear electronics for different applications like biointegrated electronics for diagnosing, treating disease, or improving brain/machine interfaces;¹⁸³ adhesive and edible food sensors;¹⁸⁴ and to attach graphene-based biosensors onto biomaterials like tooth enamel as fully biointerfaced nanosensors.¹⁸⁵ Silk-based conformal, adhesive, and edible food sensors made of RSF described by Tao et al. are also a good example for such sensors.¹⁸⁴ Different methods can be used to produce/transfer micro- and nanopatterns onto silk substrates, and Figure 8a–d shows the most common methods used by Tao and co-workers. Examples of the fabricated structures are GHz resonators, THz metamaterials and nanopatterned Au-nanoparticle plasmonic arrays on silk (Figure 8e–g).

To attach the structures to surfaces for biosensing applications, the noncrystalline (not post-treated) carrier RSF film is exposed to water vapor to be softened. The adhesive thin layer of silk acts as “glue” and can be used to adhere the antenna to the target surface without damaging the antennas. The attachment process is shown in Figure 9.

An interesting application of this technology is the monitoring of the fruit ripening process. The resonant frequency of a banana's surface was measured over 9 days while ripening, showing an initial resonance at day 0 of 36.1 MHz, which increased constantly to higher frequencies (up to 42.6 MHz at day 9) during ripening.

4. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

Silks are proteinaceous materials with a long history of use by humans. In recent decades, the structure and composition of several silk proteins of different animals have been characterized, and biotechnological protein production strategies give rise to high yields of pure proteins. The silk protein materials are biocompatible and biodegradable, but are not immunogenic, allergenic, or toxic. There are various possibilities to control the properties of silk materials, and though various processing methods (e.g., casting, printing, electrospinning, dip coating, etc.) result in a broad range of structures (e.g., films, nonwoven mats, coatings, etc.). The properties of the fabricated

materials, like material stability, surface hydrophobicity, oxygen permeability and optical properties, vary depending on the silk protein used, the processing method and the processing conditions (e.g., solvents, additives, post-treatments). Cell binding properties can be improved by modifying the surface topographies and introducing cell binding motifs. Other proteins and enzymes can be coupled to or immobilized in silk materials by chemical and genetic modification or blending. Enzymes, for instance, show high long-time stability when incorporated in silk materials. Understanding the structure–function relationship of silk proteins allows the design of sustainable and more complex and highly tailored silk-based structures like photonic nanostructures, silk inverse opals (SIO), LbL films, curvilinear electronics, optoelectronics, and biosensors.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joschka Bauer, Martin Humenik, Eileen Lintz, Kristin Schacht and Stefanie Wohlrab for helpful discussions on the manuscript and Sarah Fischer for technical help with the figures and artwork. Special thanks go to Gregor Lang for nonwoven meshes pictures of spider silk. This work is supported by the SFB 840 TP A8.

REFERENCES

- (1) Craig, C. L. Evolution of Arthropod Silks. *Annu. Rev. Entomol.* **1997**, *42*, 231–267.
- (2) Sutherland, T. D.; Young, J. H.; Weisman, S.; Hayashi, C. Y.; Merritt, D. J. Insect Silk: One Name, Many Materials. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 171–188.
- (3) Vollrath, F.; Porter, D. Spider Silk as Archetypal Protein Elastomer. *Soft Matter* **2006**, *2*, 377–385.
- (4) Newman, J.; Newman, C. Oh What a Tangled Web: The Medicinal Uses of Spider Silk. *Int. J. Dermatol.* **1995**, *34*, 290–292.
- (5) Gerritsen, V. B. The Tiptoe of an Airbus. *Protein Spotlight* **2002**, *24*, 1–2.
- (6) Gosline, J. M.; Guerette, P. A.; Ortlepp, C. S.; Savage, K. N. The Mechanical Design of Spider Silks: From Fibroin Sequence to Mechanical Function. *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 3295–3303.
- (7) Heim, M.; Keerl, D.; Scheibel, T. Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3584–3596.
- (8) Madsen, B.; Shao, Z. Z.; Vollrath, F. Variability in the Mechanical Properties of Spider Silks on Three Levels: Interspecific, Intraspecific and Intraindividual. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24*, 301–306.
- (9) Bauer, F.; Wohlrab, S.; Scheibel, T. Controllable Cell Adhesion, Growth and Orientation on Layered Silk Protein Films. *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 1244–1249.
- (10) Bauer, F.; Bertinetti, L.; Masic, A.; Scheibel, T. Dependence of Mechanical Properties of Lacewing Egg Stalks on Relative Humidity. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3730–3735.
- (11) Gührs, K.-H.; Weissart, K.; Grosse, F. Lessons from Nature – Protein Fibers. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 121–134.
- (12) Altman, G. H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R. L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D. L. Silk-Based Biomaterials. *Biomaterials* **2003**, *24*, 401–416.
- (13) Hardy, J. G.; Römer, L. M.; Scheibel, T. R. Polymeric Materials Based on Silk Proteins. *Polymer* **2008**, *49*, 4309–4327.

- (14) Leal-Egaña, A.; Scheibel, T. Silk-Based Materials for Biomedical Applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, *55*, 155–167.
- (15) Sehna, F.; Sutherland, T. Silks Produced by Insect Labial Glands. *Prion* **2008**, *2*, 145–153.
- (16) Inoue, S.; Tanaka, K.; Arisaka, F.; Kimura, S.; Ohtomo, K.; Mizuno, S. Silk Fibroin of *Bombyx mori* Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-Chain, L-Chain, and P2S, with a 6:6:1 Molar Ratio. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40517–40528.
- (17) Zhou, C.-Z.; Confalonieri, F.; Jacquet, M.; Perasso, R.; Li, Z.-G.; Janin, J. Silk Fibroin: Structural Implications of a Remarkable Amino Acid Sequence. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *44*, 119–122.
- (18) Craig, C. L.; Riekel, C. Comparative Architecture of Silks, Fibrous Proteins and Their Encoding Genes in Insects and Spiders. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *133*, 493–507.
- (19) Lintz, E. S.; Scheibel, T. R. Dragline, Egg Stalk and Byssus: A Comparison of Outstanding Protein Fibers and Their Potential for Developing New Materials. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 4467–4482.
- (20) Fu, C.; Shao, Z.; Vollrath, F. Animal Silks: Their Structures, Properties and Artificial Production. *Chem. Commun.* **2009**, 6515–6529.
- (21) Freddi, G.; Mossotti, R.; Innocenti, R. Degumming of Silk Fabric with Several Proteases. *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 101–112.
- (22) Yanagisawa, S.; Zhu, Z.; Kobayashi, I.; Uchino, K.; Tamada, Y.; Tamura, T.; Asakura, T. Improving Cell-Adhesive Properties of Recombinant *Bombyx mori* Silk by Incorporation of Collagen or Fibronectin Derived Peptides Produced by Transgenic Silkworms. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3487–3492.
- (23) Earland, C.; Robins, S. P. Isolation and Characterization of a Cystine-Containing Octapeptide from Silk. *Experientia* **1969**, *25*, 905.
- (24) Dewair, M.; Baur, X.; Ziegler, K. Use of Immunoblot Technique for Detection of Human IgE and IgG Antibodies to Individual Silk Proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1985**, *76*, 537–542.
- (25) Kurosaki, S.; Otsuka, H.; Kunitomo, M.; Koyama, M.; Pawankar, R.; Matumoto, K. Fibroin Allergy. IgE Mediated Hypersensitivity to Silk Suture Materials. *J. Nippon Med. Sch.* **1999**, *66*, 41–44.
- (26) Wen, C. M.; Ye, S. T.; Zhou, L. X.; Yu, Y. Silk-Induced Asthma in Children: A Report of 64 Cases. *Ann. Allergy* **1990**, *65*, 375–378.
- (27) Soong, H. K.; Kenyon, K. R. Adverse Reactions to Virgin Silk Sutures in Cataract Surgery. *Ophthalmology* **1984**, *91*, 479–483.
- (28) Weisman, S.; Trueman, H. E.; Mudie, S. T.; Church, J. S.; Sutherland, T. D.; Haritos, V. S. An Unlikely Silk: The Composite Material of Green Lacewing Cocoons. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3065–3069.
- (29) Lucas, F.; Shaw, J. T. B.; Smith, S. G. Amino-Acid Composition of the Silk of *Chrysopa* Egg-Stalks. *Nature* **1957**, *179*, 906–907.
- (30) Parker, K. D.; Rudall, K. M. Structure of the Silk of *Chrysopa* Egg-Stalks. *Nature* **1957**, *179*, 905–906.
- (31) Weisman, S.; Okada, S.; Mudie, S. T.; Huson, M. G.; Trueman, H. E.; Sriskantha, A.; Haritos, V. S.; Sutherland, T. D. Fifty Years Later: The Sequence, Structure and Function of Lacewing Cross-Beta Silk. *J. Struct. Biol.* **2009**, *168*, 467–475.
- (32) Bauer, F.; Scheibel, T. Artificial Egg Stalks Made of a Recombinantly Produced Lacewing Silk Protein. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 6521–6524.
- (33) Stauffer, S. L.; Coguill, S. L.; Lewis, R. V. Comparison of Physical Properties of 3 Silks from *Nephila Clavipes* and *Araneus Gemmoides*. *J. Arachnol.* **1994**, *22*, 5–11.
- (34) Vollrath, F. Biology of Spider Silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24*, 81–88.
- (35) Winkler, S.; Kaplan, D. L. Molecular Biology of Spider Silk. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 85–93.
- (36) Römer, L.; Scheibel, T. The Elaborate Structure of Spider Silk – Structure and Function of a Natural High Performance Fiber. *Prion* **2008**, *2*, 154–161.
- (37) Eisoldt, L.; Thamm, C.; Scheibel, T. Review the Role of Terminal Domains During Storage and Assembly of Spider Silk Proteins. *Biopolymers* **2012**, *97*, 355–361.
- (38) Gosline, J.; Lillie, M.; Carrington, E.; Guerette, P.; Ortlepp, C.; Savage, K. Elastic Proteins: Biological Roles and Mechanical Properties. *Philos. Trans. R. Soc., B* **2002**, *357*, 121–132.
- (39) Cranford, S. W.; Tarakanova, A.; Pugno, N. M.; Buehler, M. J. Nonlinear Material Behaviour of Spider Silk Yields Robust Webs. *Nature* **2012**, *482*, 72–76.
- (40) Elices, M.; Plaza, G. R.; Pérez-Rigueiro, J.; Guinea, G. V. The Hidden Link between Supercontraction and Mechanical Behavior of Spider Silks. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 658–669.
- (41) ap Rhisiart, A.; Vollrath, F. Design Features of the Orb Web of the Spider *Araneus diadematus*. *Behav. Ecol.* **1994**, *5*, 280–287.
- (42) Blackledge, T. A.; Summers, A. P.; Hayashi, C. Y. Gumfooted Lines in Black Widow Cobwebs and the Mechanical Properties of Spider Capture Silk. *Zoology* **2005**, *108*, 41–46.
- (43) Thiel, B. L.; Viney, C. Beta Sheets and Spider Silk. *Science* **1996**, *273*, 1480–1481.
- (44) Viney, C. Natural Silks: Archetypal Supramolecular Assembly of Polymer Fibres. *Supramol. Sci.* **1997**, *4*, 75–81.
- (45) Liu, Y.; Sponner, A.; Porter, D.; Vollrath, F. Proline and Processing of Spider Silks. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 116–121.
- (46) Ayoub, N. A.; Garb, J. E.; Tinghitella, R. M.; Collin, M. A.; Hayashi, C. Y. Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *PLoS One* **2007**, *2*, e514.
- (47) Garb, J. E.; Ayoub, N. A.; Hayashi, C. Y. Untangling Spider Silk Evolution with Spidroin Terminal Domains. *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*:243, 1–16.
- (48) Eisoldt, L.; Smith, A.; Scheibel, T. Decoding the Secrets of Spider Silk. *Mater. Today* **2011**, *14*, 80–86.
- (49) Sponner, A.; Vater, W.; Monajembashi, S.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K. Composition and Hierarchical Organisation of a Spider Silk. *PLoS One* **2007**, *2*, e998.
- (50) Hakimi, O.; Knight, D. P.; Knight, M. M.; Grah, M. F.; Vadgama, P. Ultrastructure of Insect and Spider Cocoon Silks. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2901–2908.
- (51) Rising, A.; Widhe, M.; Johansson, J.; Hedhammar, M. Spider Silk Proteins: Recent Advances in Recombinant Production, Structure–Function Relationships and Biomedical Applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 169–184.
- (52) Lefèvre, T.; Rousseau, M.-E.; Pézolet, M. Protein Secondary Structure and Orientation in Silk as Revealed by Raman Spectromicroscopy. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2885–2895.
- (53) Paquet-Mercier, F.; Lefèvre, T.; Auger, M.; Pézolet, M. Evidence by Infrared Spectroscopy of the Presence of Two Types of β -Sheets in Major Ampullate Spider Silk and Silkworm Silk. *Soft Matter* **2013**, *9*, 208–215.
- (54) Keerl, D.; Scheibel, T. Characterization of Natural and Biomimetic Spider Silk Fibers. *Bioinspired, Biomimetic Nanobiomater.* **2012**, *1*, 83–94.
- (55) Ene, R.; Papadopoulos, P.; Kremer, F. Quantitative Analysis of Infrared Absorption Coefficient of Spider Silk Fibers. *Vib. Spectrosc.* **2011**, *57*, 207–212.
- (56) Anton, M. A.; Kossack, W.; Gutsche, C.; Figuli, R.; Papadopoulos, P.; Ebad-Allah, J.; Kuntscher, C.; Kremer, F. Pressure-Dependent FTIR-Spectroscopy on the Counterbalance between External and Internal Constraints in Spider Silk of *Nephila Pilipes*. *Macromolecules* **2013**, *46*, 4919–4923.
- (57) Papadopoulos, P.; Sölter, J.; Kremer, F. Hierarchies in the Structural Organization of Spider Silk – a Quantitative Model. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 231–236.
- (58) Guehrs, K.-H.; Schlott, B.; Grosse, F.; Weisshart, K. Environmental Conditions Impinge on Dragline Silk Protein Composition. *Insect Mol. Biol.* **2008**, *17*, 553–564.
- (59) Heidebrecht, A.; Scheibel, T. Recombinant Production of Spider Silk Proteins. *Adv. Appl. Microbiol.* **2013**, *82*, 115–153.
- (60) Vendrely, C.; Scheibel, T. Biotechnological Production of Spider-Silk Proteins Enables New Applications. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 401–409.

- (61) Scheibel, T. Spider Silks: Recombinant Synthesis, Assembly, Spinning, and Engineering of Synthetic Proteins. *Microb. Cell Fact.* **2004**, *3*, 14.
- (62) Huemmerich, D.; Helsen, C. W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612.
- (63) Rammensee, S.; Slotta, U.; Scheibel, T.; Bausch, A. R. Assembly Mechanism of Recombinant Spider Silk Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6590–6595.
- (64) Sanford, K.; Kumar, M. New Proteins in a Materials World. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 416–421.
- (65) Phillips, D. M.; Drummy, L. F.; Conrady, D. G.; Fox, D. M.; Naik, R. R.; Stone, M. O.; Trulove, P. C.; De Long, H. C.; Mantz, R. A. Dissolution and Regeneration of *Bombyx mori* Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14350–14351.
- (66) Gupta, M. K.; Khokhar, S. K.; Phillips, D. M.; Sowards, L. A.; Drummy, L. F.; Kadakia, M. P.; Naik, R. R. Patterned Silk Films Cast from Ionic Liquid Solubilized Fibroin as Scaffolds for Cell Growth. *Langmuir* **2007**, *23*, 1315–1319.
- (67) Kawahara, Y.; Furukawa, K.; Yamamoto, T. Self-Expansion Behavior of Silk Fibroin Film. *Macromol. Mater. Eng.* **2006**, *291*, 458–462.
- (68) Dai, L.; Li, J.; Yamada, E. Effect of Glycerin on Structure Transition of PVA/SF Blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *86*, 2342–2347.
- (69) Lu, S.; Wang, X.; Lu, Q.; Zhang, X.; Kluge, J. A.; Uppal, N.; Omenetto, F.; Kaplan, D. L. Insoluble and Flexible Silk Films Containing Glycerol. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 143–150.
- (70) Hardy, J. G.; Scheibel, T. R. Composite Materials Based on Silk Proteins. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1093–1115.
- (71) del Campo, A.; Arzt, E. Fabrication Approaches for Generating Complex Micro- and Nanopatterns on Polymeric Surfaces. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 911–945.
- (72) Tawfik, S.; De Volder, M.; Copic, D.; Park, S. J.; Oliver, C. R.; Pelsen, E. S.; Roberts, M. J.; Hart, A. J. Engineering of Micro- and Nanostructured Surfaces with Anisotropic Geometries and Properties. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1628–1674.
- (73) Junghans, F.; Morawietz, M.; Conrad, U.; Scheibel, T.; Heilmann, A.; Spohn, U. Preparation and Mechanical Properties of Layers Made of Recombinant Spider Silk Proteins and Silk from Silk Worm. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2006**, *82*, 253–260.
- (74) Spiess, K.; Wohlrab, S.; Scheibel, T. Structural Characterization and Functionalization of Engineered Spider Silk Films. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4168–4174.
- (75) Greving, I.; Cai, M.; Vollrath, F.; Schniepp, H. C. Shear-Induced Self-Assembly of Native Silk Proteins into Fibrils Studied by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 676–682.
- (76) Zeplin, P. H.; Maksimovik, N. C.; Jordan, M. C.; Nickel, J.; Lang, G.; Leimer, A. H.; Römer, L.; Scheibel, T. Spider Silk Coatings as a Bioshield to Reduce Peroprosthetic Fibrous Capsule Formation. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 2658–2666.
- (77) Zasadzinski, J. A.; Viswanathan, R.; Madsen, L.; Garnaes, J.; Schwartz, D. K. Langmuir-Blodgett-Films. *Science* **1994**, *263*, 1726–1733.
- (78) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- (79) Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibres. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5670–5703.
- (80) Zhang, X.; Reagan, M. R.; Kaplan, D. L. Electrospun Silk Biomaterial Scaffolds for Regenerative Medicine. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 988–1006.
- (81) Zhu, J.; Shao, H.; Hu, X. Morphology and Structure of Electrospun Mats from Regenerated Silk Fibroin Aqueous Solutions with Adjusting PH. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 469–474.
- (82) Zhou, S.; Peng, H.; Yu, X.; Zheng, X.; Cui, W.; Zhang, Z.; Li, X.; Wang, J.; Weng, J.; Jia, W.; Li, F. Preparation and Characterization of a Novel Electrospun Spider Silk Fibroin/Poly(D,L-Lactide) Composite Fiber. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 11209–11216.
- (83) Park, W. H.; Jeong, L.; Yoo, D. I.; Hudson, S. Effect of Chitosan on Morphology and Conformation of Electrospun Silk Fibroin Nanofibers. *Polymer* **2004**, *45*, 7151–7157.
- (84) Zhang, F.; Zuo, B.; Fan, Z.; Xie, Z.; Lu, Q.; Zhang, X.; Kaplan, D. L. Mechanisms and Control of Silk-Based Electrospinning. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 798–804.
- (85) Boccaccini, A. R.; Keim, S.; Ma, R.; Li, Y.; Zhitomirsky, I. Electrophoretic Deposition of Biomaterials. *J. R. Soc., Interface* **2010**, *7*, S581–S613.
- (86) Maniglio, D.; Bonani, W.; Bortoluzzi, G.; Servoli, E.; Motta, A.; Migliaresi, C. Electrodeposition of Silk Fibroin on Metal Substrates. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2010**, *25*, 441–454.
- (87) Zhang, Z.; Jiang, T.; Ma, K.; Cai, X.; Zhou, Y.; Wang, Y. Low Temperature Electrophoretic Deposition of Porous Chitosan/Silk Fibroin Composite Coating for Titanium Biofunctionalization. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7705–7713.
- (88) Claussen, K. U.; Giesa, R.; Scheibel, T.; Schmidt, H.-W. Learning from Nature: Synthesis and Characterization of Longitudinal Polymer Gradient Materials Inspired by Mussel Byssus Threads. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 206–201.
- (89) Claussen, K. U.; Lintz, E. S.; Giesa, R.; Schmidt, H.-W.; Scheibel, T. Protein Gradient Films of Fibroin and Gelatine. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1396–1403.
- (90) Zhao, C.; Yao, J.; Masuda, H.; Kishore, R.; Asakura, T. Structural Characterization and Artificial Fiber Formation of *Bombyx mori* Silk Fibroin in Hexafluoro-Iso-Propanol Solvent System. *Biopolymers* **2003**, *69*, 253–259.
- (91) Stephens, J. S.; Fahnestock, S. R.; Farmer, R. S.; Kiick, K. L.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Effects of Electrospinning and Solution Casting Protocols on the Secondary Structure of a Genetically Engineered Dragline Spider Silk Analogue Investigated via Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1405–1413.
- (92) Huemmerich, D.; Slotta, U.; Scheibel, T. Processing and Modification of Films Made from Recombinant Spider Silk Proteins. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2006**, *82*, 219–222.
- (93) Slotta, U.; Tammer, M.; Kremer, F.; Koelsch, P.; Scheibel, T. Structural Analysis of Spider Silk Films. *Supramol. Chem.* **2006**, *18*, 465–471.
- (94) Ha, S.-W.; Tonelli, A. E.; Hudson, S. M. Structural Studies of *Bombyx mori* Silk Fibroin During Regeneration from Solutions and Wet Fiber Spinning. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1722–1731.
- (95) Um, I. C.; Kweon, H. Y.; Park, Y. H.; Hudson, S. Structural Characteristics and Properties of the Regenerated Silk Fibroin Prepared from Formic Acid. *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, *29*, 91–97.
- (96) Vasconcelos, A.; Freddi, G.; Cavaco-Paulo, A. Biodegradable Materials Based on Silk Fibroin and Keratin. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1299–1305.
- (97) Min, B.-M.; Jeong, L.; Nam, Y. S.; Kim, J.-M.; Kim, J. Y.; Park, W. H. Formation of Silk Fibroin Matrices with Different Texture and Its Cellular Response to Normal Human Keratinocytes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 223–230.
- (98) Spiess, K.; Ene, R.; Keenan, C. D.; Senker, J.; Kremer, F.; Scheibel, T. Impact of Initial Solvent on Thermal Stability and Mechanical Properties of Recombinant Spider Silk Films. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 13594–13604.
- (99) Wohlrab, S.; Spieß, K.; Scheibel, T. Varying Surface Hydrophobicities of Coatings Made of Recombinant Spider Silk Proteins. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 22050–22054.
- (100) Hu, X.; Lu, Q.; Kaplan, D. L.; Cebe, P. Microphase Separation Controlled β -Sheet Crystallization Kinetics in Fibrous Proteins. *Macromolecules* **2009**, *42*, 2079–2087.
- (101) Cebe, P.; Hu, X.; Kaplan, D. L.; Zhuravlev, E.; Wurm, A.; Arbeiter, D.; Schick, C. Beating the Heat - Fast Scanning Melts Silk Beta Sheet Crystals. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1130, 1–7.

- (102) Lawrence, B. D.; Wharram, S.; Kluge, J. A.; Leisk, G. G.; Omenetto, F. G.; Rosenblatt, M. I.; Kaplan, D. L. Effect of Hydration on Silk Film Material Properties. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 393–403.
- (103) Tsioris, K.; Tao, H.; Liu, M.; Hopwood, J. A.; Kaplan, D. L.; Averitt, R. D.; Omenetto, F. G. Rapid Transfer-Based Micropatterning and Dry Etching of Silk Microstructures. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2015–2019.
- (104) Young, S. L.; Gupta, M.; Hanske, C.; Fery, A.; Scheibel, T.; Tsukruk, V. V. Utilizing Conformational Changes for Patterning Thin Films of Recombinant Spider Silk Proteins. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3189–3199.
- (105) Gil, E. S.; Park, S.-H.; Marchant, J.; Omenetto, F.; Kaplan, D. L. Response of Human Corneal Fibroblasts on Silk Film Surface Patterns. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 664–673.
- (106) Tien, L. W.; Gil, E. S.; Park, S.-H.; Mandal, B. B.; Kaplan, D. L. Patterned Silk Film Scaffolds for Aligned Lamellar Bone Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 1671–1679.
- (107) Murphy, A. R.; Kaplan, D. L. Biomedical Applications of Chemically-Modified Silk Fibroin. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6443–6450.
- (108) Wohlrab, S.; Müller, S.; Schmidt, A.; Neubauer, S.; Kessler, H.; Leal-Egaña, A.; Scheibel, T. Cell Adhesion and Proliferation on RGD-Modified Recombinant Spider Silk Proteins. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6650–6659.
- (109) Romero, I. S.; Schurr, M. L.; Lally, J. V.; Kotlik, M. Z.; Murphy, A. R. Enhancing the Interface in Silk-Polypyrrole Composites through Chemical Modification of Silk Fibroin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 553–564.
- (110) Wilson, D.; Valluzzi, R.; Kaplan, D. Conformational Transitions in Model Silk Peptides. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2690–2701.
- (111) Metwalli, E.; Slotta, U.; Darko, C.; Roth, S. V.; Scheibel, T.; Papadakis, C. M. Structural Changes of Thin Films from Recombinant Spider Silk Proteins Upon Post-Treatment. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2007**, *89*, 655–661.
- (112) Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Dynamic Protein-Water Relationships During Beta-Sheet Formation. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3939–3948.
- (113) Jin, H.-J.; Park, J.; Karageorgiou, V.; Kim, U.-J.; Valluzzi, R.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. Water-Stable Silk Films with Reduced Beta-Sheet Content. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1241–1247.
- (114) Peng, H.; Zhou, S.; Jiang, J.; Guo, T.; Zheng, X.; Yu, X. Pressure-Induced Crystal Memory Effect of Spider Silk Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4636–4641.
- (115) Jin, H.-J.; Kaplan, D. L. Mechanism of Silk Processing in Insects and Spiders. *Nature* **2003**, *424*, 1057–1061.
- (116) Chen, X.; Knight, D. P.; Shao, Z.; Vollrath, F. Conformation Transition in Silk Protein Films Monitored by Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Effect of Potassium Ions on *Nephila* Spider Silk Films. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14944–14950.
- (117) Hardy, J. G.; Scheibel, T. Production and Processing of Spider Silk Proteins. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3957–3963.
- (118) Tang, X.; Ding, F.; Yang, Y.; Hu, N.; Wu, H.; Gu, X. Evaluation on *in vitro* Biocompatibility of Silk Fibroin-Based Biomaterials with Primarily Cultured Hippocampal Neurons. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2009**, *91A*, 166–174.
- (119) Meinel, L.; Hofmann, S.; Karageorgiou, V.; Kirker-Head, C.; McCool, J.; Gronowicz, G.; Zichner, L.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D. L. The Inflammatory Responses to Silk Films *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials* **2005**, *26*, 147–155.
- (120) Leal-Egaña, A.; Lang, G.; Mauerer, C.; Wickinghoff, J.; Weber, M.; Geimer, S.; Scheibel, T. Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein. *Adv. Eng. Mater.* **2012**, *14*, B67–B75.
- (121) Min, B.-M.; Lee, G.; Kim, S. H.; Nam, Y. S.; Lee, T. S.; Park, W. H. Electrospinning of Silk Fibroin Nanofibers and Its Effect on the Adhesion and Spreading of Normal Human Keratinocytes and Fibroblasts in Vitro. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1289–1297.
- (122) Sugihara, A.; Sugiura, K.; Morita, H.; Ninagawa, T.; Tubouchi, K.; Tobe, R.; Izumiya, M.; Horio, T.; Abraham, N. G.; Ikehara, S. Promotive Effects of a Silk Film on Epidermal Recovery from Full-Thickness Skin Wounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **2000**, *225*, 58–64.
- (123) Rossitch, E., Jr.; Bullard, D. E.; Oakes, W. J. Delayed Foreign-Body Reaction to Silk Sutures in Pediatric Neurosurgical Patients. *Childs Nerv. Syst.* **1987**, *3*, 375–378.
- (124) Zaoming, W.; Codina, R.; Fernández-Caldas, E.; Lockey, R. F. Partial Characterization of the Silk Allergens in Mulberry Silk Extract. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **1996**, *6*, 237–241.
- (125) Morrow, F. A.; Kogan, S. J.; Freed, S. Z.; Laufman, H. *In vivo* Comparison of Polyglycolic Acid, Chromic Catgut and Silk in Tissue of the Genitourinary Tract: An Experimental Study of Tissue Retrieval and Calclogenesis. *J. Urol.* **1974**, *112*, 655–658.
- (126) Nebel, L.; Rosenberg, G.; Tobias, B.; Nathan, H. Autograft Suture in Peripheral Nerves. *Eur. Surg. Res.* **1977**, *9*, 224–234.
- (127) Peleg, H.; Rao, U. N. M.; Emrich, L. J. An Experimental Comparison of Suture Materials for Tracheal and Bronchial Anastomoses. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1986**, *34*, 384–388.
- (128) Yucel, T.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. Structural Origins of Silk Piezoelectricity. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 779–785.
- (129) Jiang, C.; Wang, X.; Gunawidjaja, R.; Lin, Y.-H.; Gupta, M. K.; Kaplan, D. L.; Naik, R. R.; Tsukruk, V. V. Mechanical Properties of Robust Ultrathin Silk Fibroin Films. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 2229–2237.
- (130) Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A. Synthetic Biomaterials as Instructive Extracellular Microenvironments for Morphogenesis in Tissue Engineering. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 47–55.
- (131) Engler, A. J.; Humbert, P. O.; Wehrle-Haller, B.; Weaver, V. M. Multiscale Modeling of Form and Function. *Science* **2009**, *324*, 208–212.
- (132) Vogel, V. Mechanotransduction Involving Multimodular Proteins: Converting Force into Biochemical Signals. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 459–488.
- (133) Sofia, S.; McCarthy, M. B.; Gronowicz, G.; Kaplan, D. L. Functionalized Silk-Based Biomaterials for Bone Formation. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2001**, *54*, 139–148.
- (134) Gao, Z.; Wang, S.; Zhu, H.; Su, C.; Xu, G.; Lian, X. Using Selected Uniform Cells in Round Shape with a Micropipette to Measure Cell Adhesion Strength on Silk Fibroin-Based Materials. *Mater. Sci. Eng., C* **2008**, *28*, 1227–1235.
- (135) Kim, J.-Y.; Choi, J.-Y.; Jeong, J.-H.; Jang, E.-S.; Kim, A.-S.; Kim, S.-G.; Kweon, H. Y.; Jo, Y.-Y.; Yeo, J.-H. Low Molecular Weight Silk Fibroin Increases Alkaline Phosphatase and Type I Collagen Expression in Mg63 Cells. *BMB Rep.* **2010**, *43*, 52–56.
- (136) Salber, J.; Gräter, S.; Harwardt, M.; Hofmann, M.; Klee, D.; Dujic, J.; Jinghuan, H.; Ding, J.; Kippenberger, S.; Bernd, A.; Groll, J.; Spatz, J. P.; Möller, M. Influence of Different ECM Mimetic Peptide Sequences Embedded in a Nonfouling Environment on the Specific Adhesion of Human-Skin Keratinocytes and Fibroblasts on Deformable Substrates. *Small* **2007**, *3*, 1023–1031.
- (137) Vogler, E. A. Structure and Reactivity of Water at Biomaterial Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *74*, 69–117.
- (138) Vogler, E. A. Water and the Acute Biological Response to Surfaces. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1999**, *10*, 1015–1045.
- (139) Widhe, M.; Bysell, H.; Nystedt, S.; Schenning, I.; Malmsten, M.; Johansson, J.; Rising, A.; Hedhammar, M. Recombinant Spider Silk as Matrices for Cell Culture. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9575–9585.
- (140) Scheller, J.; Henggeler, D.; Viviani, A.; Conrad, U. Purification of Spider Silk-Elastin from Transgenic Plants and Application for Human Chondrocyte Proliferation. *Transgenic Res.* **2004**, *13*, 51–57.
- (141) Bini, E.; Foo, C. W. P.; Huang, J.; Karageorgiou, V.; Kitchel, B.; Kaplan, D. L. RGD-Functionalized Bioengineered Spider Dragline Silk Biomaterial. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3139–3145.
- (142) Widhe, M.; Johansson, U.; Hillerdahl, C.-O.; Hedhammar, M. Recombinant Spider Silk with Cell Binding Motifs for Specific Adherence of Cells. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8223–8234.
- (143) Morgan, A. W.; Roskov, K. E.; Lin-Gibson, S.; Kaplan, D. L.; Becker, M. L.; Simon, C. G., Jr. Characterization and Optimization of RGD-Containing Silk Blends to Support Osteoblastic Differentiation. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2556–2563.

- (144) Hardy, J. G.; Pfaff, A.; Leal-Egaña, A.; Müller, A. H. E.; Scheibel, T. R. Glycopolymers Functionalization of Engineered Spider Silk Protein-Based Materials for Improved Cell Adhesion. *Macromol. Biosci.* **2014**, DOI: 10.1002/mabi.201400020.
- (145) Das, S.; Pati, D.; Tiwari, N.; Nisal, A.; Sen Gupta, S. Synthesis of Silk Fibroin-Glycopolypeptide Conjugates and Their Recognition with Lectin. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3695–3702.
- (146) Foo, C. W. P.; Patwardhan, S. V.; Belton, D. J.; Kitchel, B.; Anastasiades, D.; Huang, J.; Naik, R. R.; Perry, C. C.; Kaplan, D. L. Novel Nanocomposites from Spider Silk-Silica Fusion (Chimeric) Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 9428–9433.
- (147) Mieszawska, A. J.; Fourligas, N.; Georgakoudi, I.; Ouhib, N. M.; Belton, D. J.; Perry, C. C.; Kaplan, D. L. Osteoinductive Silk-Silica Composite Biomaterials for Bone Regeneration. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8902–8910.
- (148) Mieszawska, A. J.; Nadkarni, L. D.; Perry, C. C.; Kaplan, D. L. Nanoscale Control of Silica Particle Formation via Silk-Silica Fusion Proteins for Bone Regeneration. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 5780–5785.
- (149) Bettinger, C. J.; Langer, R.; Borenstein, J. T. Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5406–5415.
- (150) Biggs, M. J.; Richards, R. G.; Gadegaard, N.; McMurray, R. J.; Affrossman, S.; Wilkinson, C. D. W.; Oreffo, R. O. C.; Dalby, M. J. Interactions with Nanoscale Topography: Adhesion Quantification and Signal Transduction in Cells of Osteogenic and Multipotent Lineage. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2009**, *91A*, 195–208.
- (151) Zhang, K.; Mo, X.; Huang, C.; He, C.; Wang, H. Electrospun Scaffolds from Silk Fibroin and Their Cellular Compatibility. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2010**, *93A*, 976–983.
- (152) Zhang, X.; Baughman, C. B.; Kaplan, D. L. *In vitro* Evaluation of Electrospun Silk Fibroin Scaffolds for Vascular Cell Growth. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2217–2227.
- (153) Lewicka, M.; Hermanson, O.; Rising, A. U. Recombinant Spider Silk Matrices for Neural Stem Cell Cultures. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7712–7717.
- (154) Hronik-Tupaj, M.; Raja, W. K.; Tang-Schomer, M.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. Neural Responses to Electrical Stimulation on Patterned Silk Films. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2013**, *101A*, 2559–2572.
- (155) Dal Prà, I.; Petrini, P.; Charini, A.; Bozzini, S.; Farè, S.; Armato, U. Silk Fibroin-Coated Three-Dimensional Polyurethane Scaffolds for Tissue Engineering: Interactions with Normal Human Fibroblasts. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 1113–1121.
- (156) Karageorgiou, V.; Meinel, L.; Hofmann, S.; Malhotra, A.; Volloch, V.; Kaplan, D. Bone Morphogenetic Protein-2 Decorated Silk Fibroin Films Induce Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2004**, *71*, 528–537.
- (157) He, G.; Dahl, T.; Veis, A.; George, A. Nucleation of Apatite Crystals *In Vitro* by Self-Assembled Dentin Matrix Protein, 1. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 552–558.
- (158) Zhao, J.; Zhang, Z.; Wang, S.; Sun, X.; Zhang, X.; Chen, J.; Kaplan, D. L.; Jiang, X. Apatite-Coated Silk Fibroin Scaffolds to Healing Mandibular Border Defects in Canines. *Bone* **2009**, *45*, 517–527.
- (159) Perrone, G. S.; Leisk, G. G.; Lo, T. J.; Moreau, J. E.; Haas, D. S.; Papenburg, B. J.; Golden, E. B.; Partlow, B. P.; Fox, S. E.; Ibrahim, A. M.; Lin, S. J.; Kaplan, D. L. The Use of Silk-Based Devices for Fracture Fixation. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–9.
- (160) Currie, H. A.; Deschaume, O.; Naik, R. R.; Perry, C. C.; Kaplan, D. L. Genetically Engineered Chimeric Silk-Silver Binding Proteins. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 2889–2895.
- (161) Pritchard, E. M.; Valentin, T.; Panilaitis, B.; Omenetto, F.; Kaplan, D. L. Antibiotic-Releasing Silk Biomaterials for Infection Prevention and Treatment. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 854–861.
- (162) Gomes, S.; Gallego-Llamas, J.; Leonor, I. B.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Kaplan, D. L. *In Vivo* Biological Responses to Silk Proteins Functionalized with Bone Sialoprotein. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 444–454.
- (163) Minoura, N.; Tsukada, M.; Nagura, M. Physicochemical Properties of Silk Fibroin Membrane as a Biomaterial. *Biomaterials* **1990**, *11*, 430–434.
- (164) Minoura, N.; Tsukada, M.; Nagura, M. Fine-Structure and Oxygen Permeability of Silk Fibroin Membrane Treated with Methanol. *Polymer* **1990**, *31*, 265–269.
- (165) Mori, H.; Tsukada, M. New Silk Protein: Modification of Silk Protein by Gene Engineering for Production of Biomaterials. *J. Biotechnol.* **2000**, *74*, 95–103.
- (166) Tao, H.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Silk Materials - a Road to Sustainable High Technology. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2824–2837.
- (167) Perry, H.; Gopinath, A.; Kaplan, D. L.; Dal Negro, L.; Omenetto, F. G. Nano- and Micropatterning of Optically Transparent, Mechanically Robust, Biocompatible Silk Fibroin Films. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3070–3072.
- (168) Lawrence, B. D.; Cronin-Golomb, M.; Georgakoudi, I.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Bioactive Silk Protein Biomaterial Systems for Optical Devices. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1214–1220.
- (169) Parker, S. T.; Domachuk, P.; Amsden, J.; Bressner, J.; Lewis, J. A.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Biocompatible Silk Printed Optical Waveguides. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2411–2415.
- (170) Zhang, Y.-Q. Natural Silk Fibroin as a Support for Enzyme Immobilization. *Biotechnol. Adv.* **1998**, *16*, 961–971.
- (171) Demura, M.; Asakura, T. Immobilization of Glucose Oxidase with *Bombyx mori* Silk Fibroin by Only Stretching Treatment and Its Application to Glucose Sensor. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *33*, 598–603.
- (172) Zhang, Y.-Q.; Zhu, J.; Gu, R.-A. Improved Biosensor for Glucose Based on Glucose Oxidase-Immobilized Silk Fibroin Membrane. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1998**, *75*, 215–233.
- (173) Lu, S.; Wang, X.; Lu, Q.; Hu, X.; Uppal, N.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. Stabilization of Enzymes in Silk Films. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1032–1042.
- (174) Asakura, T.; Kitaguchi, M.; Demura, M.; Sakai, H.; Komatsu, K. Immobilization of Glucose Oxidase on Nonwoven Fabrics with *Bombyx mori* Silk Fibroin Gel. *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *46*, 49–53.
- (175) Tao, H.; Kainerstorfer, J. M.; Siebert, S. M.; Pritchard, E. M.; Sassaroli, A.; Panilaitis, B. J. B.; Brenckle, M. A.; Amsden, J. J.; Levitt, J.; Fantini, S.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Implantable, Multifunctional, Bioresorbable Optics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 19584–19589.
- (176) Moraes, M. L.; Lima, L. R.; Silva, R. R.; Cavicchioli, M.; Ribeiro, S. J. L. Immunosensor Based on Immobilization of Antigenic Peptide NS5A-1 from HCV and Silk Fibroin in Nanostructured Films. *Langmuir* **2013**, *29*, 3829–3834.
- (177) Lu, Q.; Wang, X.; Zhu, H.; Kaplan, D. L. Surface Immobilization of Antibody on Silk Fibroin through Conformational Transition. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2782–2786.
- (178) Kim, S.; Mitropoulos, A. N.; Spitzberg, J. D.; Tao, H.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Silk Inverse Opals. *Nat. Photonics* **2012**, *6*, 818–823.
- (179) MacLeod, J.; Rosei, F. Photonic Crystals: Sustainable Sensors from Silk. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 98–100.
- (180) Kim, S.; Mitropoulos, A. N.; Spitzberg, J. D.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Silk Protein Based Hybrid Photonic-Plasmonic Crystal. *Opt. Express* **2013**, *21*, 8897–8903.
- (181) Diao, Y. Y.; Liu, X. Y.; Toh, G. W.; Shi, L.; Zi, J. Multiple Structural Coloring of Silk-Fibroin Photonic Crystals and Humidity-Responsive Color Sensing. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 5373–5380.
- (182) Lin, D.; Tao, H.; Trevino, J.; Mondia, J. P.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G.; Dal Negro, L. Direct Transfer of Subwavelength Plasmonic Nanostructures on Bioactive Silk Films. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 6088–6093.
- (183) Kim, D.-H.; Viventi, J.; Amsden, J. J.; Xiao, J.; Vigeland, L.; Kim, Y.-S.; Blanco, J. A.; Panilaitis, B.; Frechette, E. S.; Contreras, D.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G.; Huang, Y.; Hwang, K.-C.; Zakin, M. R.; Litt, B.; Rogers, J. A. Dissolvable Films of Silk Fibroin for Ultrathin Conformal Bio-Integrated Electronics. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 511–517.
- (184) Tao, H.; Brenckle, M. A.; Yang, M.; Zhang, J.; Liu, M.; Siebert, S. M.; Averitt, R. D.; Mannoor, M. S.; McAlpine, M. C.; Rogers, J. A.

Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Silk-Based Conformal, Adhesive, Edible Food Sensors. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1067–1072.

(185) Mannoer, M. S.; Tao, H.; Clayton, J. D.; Sengupta, A.; Kaplan, D. L.; Naik, R. R.; Verma, N.; Omenetto, F. G.; McAlpine, M. C. Graphene-Based Wireless Bacteria Detection on Tooth Enamel. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1–8.

8. Danksagung

Diese Arbeit wurde in den letzten Jahren (Mai 2011 – August 2015) am Lehrstuhl Biomaterialien der Universität Bayreuth angefertigt.

Zunächst möchte ich mich besonders bei meinem wissenschaftlichen Mentor und Betreuer Prof. Dr. Thomas Scheibel für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas, auf welchem ich promovieren durfte, bedanken.

Besonderem Dank gelten auch Prof. Dr. Franz X. Schmid sowie Prof. Benedikt Westermann für die Übernahme meines Mentorats.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Johannes Diehl und Andreas Schmidt für die Herstellung verschiedener Proteine
- Dr. Hendrik Bargel für die REM Aufnahmen
- Dr. Martin Humenik und Dr. Christopher Synatschke für die Vorbereitung und Durchführung der MALDI-TOF Analysen
- Nicolas Helfricht für die Hilfe bei den Zeta-Potential Messungen
- Dr. Katharina Mahal für die Diskussionen zur Durchführung der Durchflusszytometrie-Messungen
- Martina Heider und Dr. Beate Förster für ihre Hilfen bei den REM Messungen
- Meiner früheren Masterstudentin und jetzigen Kollegin Heike M. Herold für ihre Mitarbeit bei der Herstellung der Tat-modifizierten Proteine

Bei Jasmin, Anderl, Johannes, Dani, Alexandra und Eva bedanke ich mich für ihre Unterstützung im Laboralltag. Ohne sie wäre ein reibungsloser Ablauf der Versuche nicht möglich gewesen. Susanne Schramm danke ich für die Bewältigung aller organisatorischen Angelegenheiten, ihre freundliche Art und ihr stets offenes Ohr. Bei Andrea Bodner und Katja Weiner bedanke ich mich ebenfalls für die Unterstützung bei organisatorischen Aufgaben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Martin Humenik, der mit seinen wissenschaftlichen Anregungen, seinem fundierten Fachwissen, Ratschlägen, konstruktiver Kritik und steter Diskussionsbereitschaft einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen, die sich die Zeit genommen haben diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Danken möchte ich auch allen alten Fibers und neuen BioMatlern für die tolle Arbeitsatmosphäre, Hilfe im Labor, viele lustige Momente und für die netten Kaffeepausen. Dabei gilt mein besonderer Dank meinen „alten“ und „neuen“ Bürokollegen Claudia, Steffi, Bruno, Kristin, Heike und Tamara für die konstruktive und freundliche Büroatmosphäre, wissenschaftlichen Diskussionen und die tolle Zeit. Darüber hinaus danke ich Michael, Lukas, Claudia, Felix, Markus und Martin für die wissenschaftlichen Diskussionen, gerade am Anfang meiner Doktorarbeit.

Natürlich gilt mein herzlichster Dank auch meiner Familie, die mich stets ermutigt, unterstützt und dies überhaupt erst möglich gemacht hat. Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Mann Andi. Er stand mir während der gesamten Zeit treu zur Seite, hat vieles ertragen müssen, und war doch stets für mich da.

Vielen Dank

9. Erklärung

(§ 8 Nr. 6 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronischen Fassungen meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 Nr. 8 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 Nr. 9 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§8 Nr. 10 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -Vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....
Ort, Datum

.....
(Martina B. Schierling geb. Elsner)

